

**ZUR ATP-BESTIMMUNG IM SPERMA EINIGER
HAUSTIERARTEN MIT DEM
BIOLUMINESZENZVERFAHREN**

Jakob Pfetsch

1980

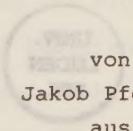


Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

ZUR ATP-BESTIMMUNG IM SPERMA EINIGER HAUSTIERARTEN
MIT DEM BIOLUMINESZENZVERFAHREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von
Jakob Pfetsch
aus
Berghülen

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. E. Scharrer

Tag der Promotion: 29. Februar 1980



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. ATP im Spermienstoffwechsel	2
2.1.1. Biochemie von ATP	2
2.1.2. Spermienstoffwechsel	4
2.1.2.1. Glykolyse	4
2.1.2.2. Exogene und endogene Respiration	5
2.1.3. Energiegewinn bei den Stoffwechsel- vorgängen	8
2.1.4. ATP und Spermienmotilität	9
2.1.5. Endogener und exogener Abbau von ATP	10
2.2. Die Messung von ATP im Sperma	11
2.2.1. Grundlagen der Biolumineszenz	11
2.2.1.1. Wesen und Bedeutung	11
2.2.1.2. Prinzip und Meßbedingungen	12
2.2.1.3. Die Messung beeinflussende Faktoren	14
2.2.1.4. Reaktionskinetik der ATP-Messung	15
2.2.2. ATP-Bestimmung im Sperma mittels Biolumineszenz	16
2.2.3. ATP-Gehalt im Sperma	19
2.2.4. Beeinflussung des ATP-Gehalts im Sperma	23

	Seite
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1. Material und Methode	25
3.1.1. Versuchstiere und Spermagewinnung	25
3.1.1.1. Voruntersuchung der Ejakulate	25
3.1.1.2. Meßgeräte und Reagenzien zur ATP-Bestimmung	26
3.1.2. Vorversuche zur ATP-Bestimmung im Sperma	30
3.1.2.1. Bestimmung des Meßbereichs für Spermaproben; Meßmodus	30
3.1.2.1.1. Celltester	30
3.1.2.1.2. Luminometer	31
3.1.2.2. Bestimmung der Reproduzierbarkeit bei der Messung von Standardansätzen und Spermaproben	32
3.1.2.3. Erstellung der Eichkurve und interne Standardisierung	34
3.1.2.4. Bestimmung des Einflusses von Sperma-verdünnern auf das Lumineszenzsystem	36
3.1.3. ATP-Bestimmung im Sperma	37
3.1.3.1. Untersuchung der Reaktionskinetik bei der Messung von Spermaproben	37
3.1.3.2. Untersuchung des Einflusses von Samenplasma auf die ATP-Messung	38
3.1.3.2.1. Untersuchung über den Einfluß von nach Kastration (Bulle) bzw. Vaso-ligatur (Kaninchenbock) gewonnenem Samenplasma auf die ATP-Messung	39

	Seite
3.1.3.2.2. Untersuchungen über den Einfluß von freien Protoplastatröpfchen auf die ATP-Messung	40
3.1.3.3. Bestimmung des ATP-Gehalts ejaku- lierter und gewaschener Spermien der verschiedenen Spezies	42
3.1.3.4. Untersuchung der Beziehung des ATP-Gehalts von Spermaproben zur Spermienmotilität sowie dem Anteil lebender Spermien	46
3.2. Ergebnisse	48
3.2.1. Vorversuche zur ATP-Bestimmung im Sperma	48
3.2.1.1. Meßbereich für Spermaproben	48
3.2.1.1.1. Celltester	48
3.2.1.1.2. Luminometer	50
3.2.1.2. Reproduzierbarkeit der Messung von Standardansätzen und Spermaproben	50
3.2.1.3. Eichkurve und interne Standardisierung	54
3.2.1.4. Einfluß von verschiedenen Sperma- verdünnern auf das Lumineszenzsystem	60
3.2.2. ATP-Bestimmung im Sperma	64
3.2.2.1. Reaktionskinetik bei der Messung von Spermaproben	64
3.2.2.2. Einfluß des Samenplasmas auf die ATP-Messung	70
3.2.2.2.1. Einfluß von nach Kastration (Bulle) bzw. Vasoligatur (Kaninchenbock) ge- wonnenem Samenplasma auf die ATP- Messung	72

	Seite
3.2.2.2.2. Einfluß von freien Protoplasma- tröpfchen auf die ATP-Messung	74
3.2.2.3. ATP-Gehalt ejakulierter und ge- waschener Spermien der ver- schiedenen Spezies	76
3.2.2.4. Beziehung des ATP-Gehalts von Spermaproben zur Spermienmotilität sowie dem Anteil lebender Spermien	78
4. DISKUSSION	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. LITERATURVERZEICHNIS	97

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Es ist seit langem bekannt, daß eine enge Korrelation zwischen dem Spermienstoffwechsel und der Spermienmotilität besteht. Objektive Verfahren zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität sind zeitraubend und aufwendig, die Motilitätsschätzung ist subjektiv und erlaubt nur eine indirekte Aussage über den Stoffwechsel.

ATP (Adenosintriphosphat) ist ein energiereiches Nucleotid, das eine Schlüsselstellung als Verbindungs-glied zwischen Spermienstoffwechsel und -motilität einnimmt (MANN, 1964). Es erscheint daher als Parameter für die Stoffwechselrate und daraus resultierend für die Motilität in der spermatologischen Diagnostik besonders geeignet.

Von der Industrie werden neuerdings Geräte angeboten, mit denen - basierend auf der Biolumineszenzreaktion - mit relativ wenig Aufwand, geringste Mengen von ATP in Zellen nachgewiesen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei Geräten verschiedener Hersteller überprüft, ob ATP im Sperma gemessen werden kann, und welche technischen Voraussetzungen zu berücksichtigen sind. Darüber hinaus sollte versucht werden, den Einfluß des Samenplasmas auf die ATP-Bestimmung darzustellen, den ATP-Gehalt im Sperma von verschiedenen Haustierarten zu messen sowie den Zusammenhang mit der Motilität zu untersuchen.

2. LITERATUR

2.1. ATP im Spermienstoffwechsel

2.1.1. Biochemie von ATP

ATP ist ein energiereiches Nucleosidtriphosphat. Die einzelnen Komponenten der Verbindung sind eine Base (Adenin), ein zyklischer 5-er Zucker (Ribose) und drei Phosphatreste. Sie besitzt zwei energiereiche Pyrophosphatbindungen, die bei energieverbrauchenden Reaktionen als unmittelbare Energiequelle dienen (Abb. 1). Dabei kann ATP unter Abspaltung der terminalen Phosphatgruppe, der terminalen Pyrophosphatgruppe oder aller Phosphatreste in Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) oder Adenosin übergehen. Diese Reaktionen werden von speziellen Enzymen katalysiert (BUDDECKE, 1974).

ATP ist in jeder lebenden Zelle vorhanden und wird auch dort gebildet. Auf die einzelnen Schritte der Biosynthese soll nicht eingegangen werden. Das bei der Spaltung von ATP gebildete ADP bzw. AMP wird im Zellstoffwechsel wieder zu ATP regeneriert. Die Resynthese ist mit energieliefernden Reaktionen gekoppelt und findet vor allem im Rahmen der anaeroben Glykolyse und der Zellatmung statt. Durch diese Stoffwechselprozesse wird der ATP-Spiegel in der Zelle konstant gehalten (BUDDECKE, 1974).

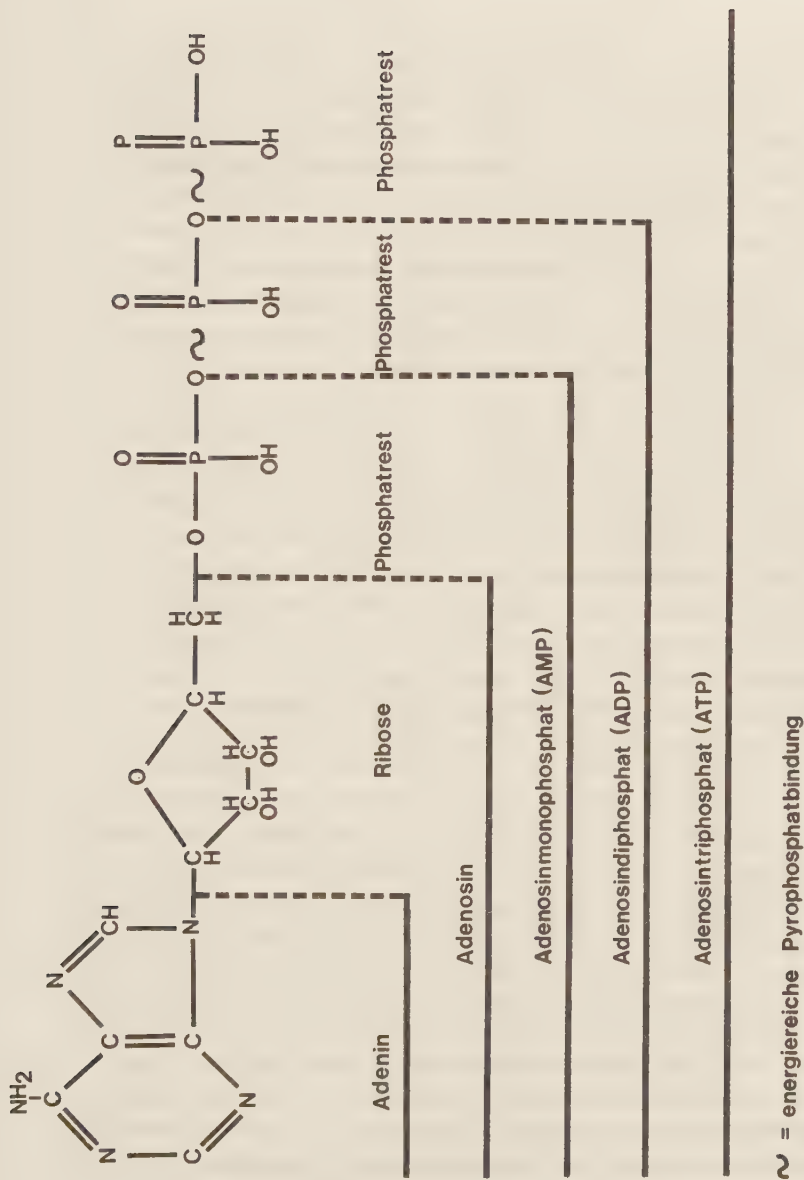


Abb. 1 : Chemische Struktur von ATP

2.1.2. Spermienstoffwechsel

Im Gegensatz zu somatischen Zellen besitzen Samenzellen kaum Zytoplasma. Sie müssen deshalb ihre Nährsubstrate für den Stoffwechsel aus dem sie umgebenen Samenplasma beziehen. Der Ab- und Umbau der Nährsubstrate erfolgt unter anaeroben Bedingungen durch die Glykolyse, in Gegenwart von Sauerstoff durch die Respiration. Der anaeroben Glykolyse kommt dabei die größere Bedeutung zu (MANN, 1945b).

2.1.2.1. Glykolyse

Ursprünglich wurde angenommen, daß Glukose der im Samenplasma enthaltene Zucker sei, der durch die Glykolyse abgebaut wird. MANN (1946) identifizierte jedoch den im Seminalplasma von Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Kaninchen und Mensch mengenmäßig überwiegenden Zucker als D(-)Fruktose. Es wird daher auch der Begriff Fruktolyse verwendet.

Die Fruktosekonzentration im Sperma schwankt zwischen den Haustierarten und individuell sehr stark. Bei den Spezies mit niedrigem Fruktoseanteil, wie z.B. beim Pferd oder auch beim Kaninchen, kommen geringe Konzentrationen anderer Zucker wie Glukose oder Mannose vor, die ebenfalls auf glykolytischem Weg abgebaut werden (DÖCKE, 1963; MANN, 1964).

In der ersten Phase der anaeroben Glykolyse wird das Zuckermolekül durch ATP "aktiviert". Dabei wird Fruktose in Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Im weiteren Verlauf entsteht dann in Anwesenheit von ATP Fruktose-1.6.-Diphosphat, das in zwei Triosemoleküle

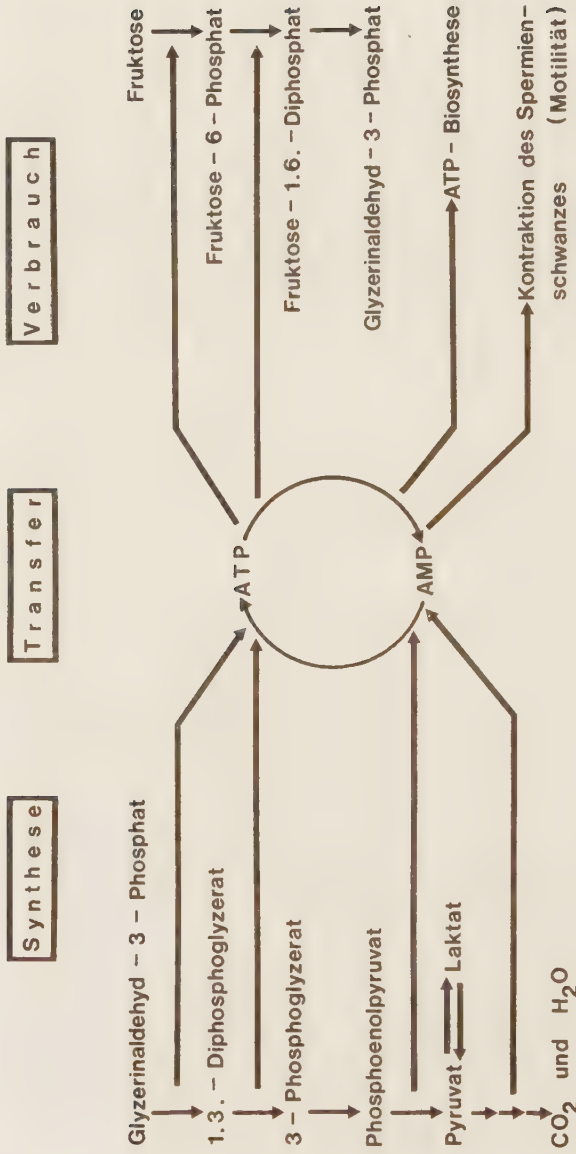
(Dihydroxyacetonphosphat und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat) gespalten wird. Diese beiden Triosen stehen über die gemeinsame Enolform in einem Gleichgewicht, das fast ausschließlich auf Seiten des Dihydroxyacetonphosphats liegt. Die nachfolgende Oxydation des Glyzerinaldehyd-3-Phosphats verläuft als Dehydrierung, wobei der Wasserstoff auf Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) übertragen wird. Es entsteht reduziertes NAD, das indirekt über die Atmungskette in ATP umgewandelt wird (s. 2.1.2.2.). Durch anschließende Anlagerung von anorganischem Phosphat entsteht nun 1.3.-Diphosphoglyzerat. Der Phosphatrest wird auf ADP übertragen und damit 3-Phosphoglyzerat und ATP gebildet. Aus 3-Phosphoglyzerat entsteht dann über Phosphoenolpyruvat Pyruvat und schließlich Laktat als Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Beim Übergang von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat wird nochmals ATP frei, so daß bei insgesamt drei Reaktionsschritten ATP gebildet wird (Abb. 2).

2.1.2.2. Exogene und endogene Respiration

In Gegenwart von Sauerstoff können Spermien Laktat im Zitratzyklus und der Atmungskette zu CO_2 und H_2O weiteroxydieren.

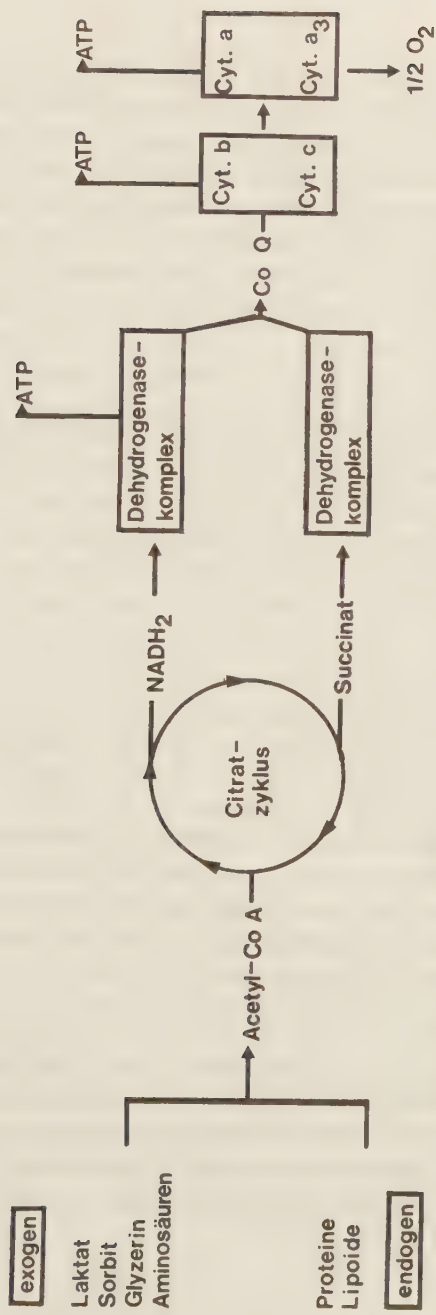
Stammen die Substrate für den aeroben Abbau aus dem Samenplasma, beispielsweise Sorbit, Glyzerin und Aminosäuren, so spricht man von exogener Respiration (EIBL, 1959; MANN, 1964).

Bei der endogenen Respiration werden dagegen vorwiegend in der Samenzelle enthaltene Substanzen wie Proteine und Lipide unter Sauerstoffzutritt der Verbrennung zugeführt. Die endogene Respiration stellt somit eine Energiereserve nach dem Verbrauch exogener Nährsubstrate dar und führt zu einer Energieausbeute in Form von ATP (Abb. 3).



mod. nach SALISBURY und VAN DEMARK (1961)

Abb. 2: ATP im Spermienstoffwechsel



Co Q = Coenzym Q (Ubichinon)
Cyt. = Cytochrom

mod. nach PETERSON und FREUND (1970)

Abb. 3 : Spermienrespiration

Die aus dem respiratorischen Stoffwechsel gewonnene Energie wird zum Teil für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verbraucht, der grössere Teil geht als Wärme verloren. Pro Mol oxydiertem Wasserstoff werden drei Mol ATP gebildet (Abb. 3), nämlich bei der Oxydation von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH_2), beim Übergang der Elektronen vom Cytochrom b auf Cytochrom c und im Verlauf der Oxydation von Cytochrom c (BUDDECKE, 1974).

Während hohe CO_2 -Konzentrationen bei Nebenhodenspermien zu einer Herabsetzung von Stoffwechsel und Motilität führen, stimuliert das bei der Respiration als Endprodukt anfallende Kohlendioxid die Sauerstoffaufnahme und dadurch den oxydativen Stoffwechsel ejakulierter Spermien (SALISBURY und LODGE, 1963).

2.1.3. Energiegewinn bei den Stoffwechselvorgängen

Bei der Glykolyse entsteht ein Nettoenergiegewinn von zwei Molekülen ATP pro Molekül Fruktose bzw. Glukose oder Mannose. Für die Respiration errechnet sich insgesamt ein theoretischer Energiegewinn von 38 Molekülen ATP pro Molekül Hexose. Demnach wäre der respiratorische Stoffwechselweg für die Spermien effektiver in bezug auf den Energiegewinn.

PETERSON und FREUND (1970) konnten beweisen, daß bei humanen Spermatozoen in Abwesenheit von glykolysierbaren Substraten der ATP-Gehalt der Spermien innerhalb von 3 Stunden auf 10 % des ursprünglichen Wertes und die Motilität von 40 % auf 10 % abfiel. Die Autoren folgern daraus, daß die Spermien die für die

Motilität erforderliche Energie vorwiegend aus dem glykolytischen Stoffwechsel beziehen.

Während NEVO (1966) dem oxydativen Stoffwechsel nur eine die Spermienmotilität unterstützende Wirkung zusagt, konnten RIKMENSPOEL und VAN HERPEN (1969) zeigen, daß durch die Respiration die volle Motilität aufrechterhalten werden kann.

2.1.4. ATP und Spermienmotilität

Die unmittelbare Energiequelle für die Eigenbewegung der Spermien ist das aus dem Stoffwechsel gewonnene ATP. Es wird dabei mehr ATP synthetisiert, als für die Motilität der Samenzelle notwendig ist. Die Synthesevorgänge laufen im Mittelstück ab, verbraucht wird ATP entlang des gesamten Spermienchwanzes. Der Transport erfolgt durch Diffusion. Das überschüssige ATP wird als Energiereservoir im Spermienchwanz gespeichert (NEVO und RIKMENSPOEL, 1970).

Die kontraktile Elemente im Spermienchwanz sind in ihrem chemischen Aufbau ähnlich dem Muskelmyosin. Die Kontraktion erfolgt durch die Bildung eines "Aktomyosinkomplexes" in Anwesenheit von ATP. Dabei wird das ATP durch ATP-asen gespalten und chemische in mechanische Energie umgewandelt (SALISBURY und VAN DEMARK, 1961).

HOSKINS et al. (1971) kamen durch die Bestimmung von Stoffwechselzwischenprodukten, Enzymen und Nucleotiden bei ejakulierten Affenspermien zu dem Ergebnis, daß die Fruktolyserate im Säugetiersperma positiv

mit dem Verhältnis der ATP- zu ADP- und AMP-Konzentration korreliert sei. Bei hoher Stoffwechselrate ergab sich ein $[ATP]/[ADP]+[AMP]$ -Quotient von 0,5 - d.h. bei motilen Spermien war die ADP- plus AMP-Konzentration doppelt so hoch wie die ATP-Konzentration.

2.1.5. Endogener und exogener Abbau von ATP

Der intrazelluläre Abbau von ATP steht in direktem Zusammenhang zur Spermienmotilität. Die katalysierenden Enzyme sind ATP-asen, denen als Initiator der Motilität eine besondere Bedeutung zukommt. Die ATP-asen sind in speziellen intrazellulären Organellen - den Mikrotubuli - in den axialen Filamenten lokalisiert (BACCETTI und AFZELIUS, 1976).

Bereits 1972 gelang DURR et al. der Nachweis von zwei verschiedenen ATP-asen in humanen Spermatozoen. Mit Hilfe radioaktiver Markierung von ATP, ADP und AMP sowie deren chromatographischer Trennung konnte experimentell gezeigt werden, daß ATP über ADP und AMP schließlich zu Adenosin hydrolysiert wird (ABLA et al., 1974). Wie lange der intrazelluläre ATP-Pool nach Verbrauch der exogenen und endogenen Nährsubstrate aufrechterhalten wird, ist bisher nicht bekannt.

Auch im Samenplasma von Schafbock und Bulle sind spezifische ATP-asen nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei um eine saure und eine alkalische Phosphatase sowie um eine pyrophosphatbildende ATP-ase. Der ADP-Abbau wird ebenfalls von im Seminalplasma enthaltenen Phosphatasen katalysiert. AMP wird durch eine 5-Nucleotidase gespalten (HEPPEL und HILMOE, 1953; MANN, 1964).

2.2. Die Messung von ATP im Sperma

Die in der Biochemie und Mikrobiologie eingesetzten analytischen Verfahren zur ATP-Bestimmung haben wegen ihrer Aufwendigkeit keinen Eingang in die Spermauntersuchung gefunden. Nachdem nun auf der Biolumineszenz basierende Meßgeräte hergestellt werden, mit denen in kürzester Zeit und mit relativ wenig Aufwand ATP bestimmt werden kann, bieten sich auch in der Spermatologie Einsatzmöglichkeiten.

2.2.1. Grundlagen der Biolumineszenz

2.2.1.1. Wesen und Bedeutung

Bei chemischen Reaktionen können Moleküle vorübergehend in einen höheren Anregungszustand versetzt werden. Wird beim Zurückgehen auf den Grundzustand ein Photon frei, so nennt man dies Chemilumineszenz. Lichtemittierende Reaktionen in lebenden Zellen werden als Biolumineszenz bezeichnet.

Seit langem sind Tiere bekannt, die durch Biolumineszenzreaktionen kaltes Licht erzeugen. Neben Leuchtbakterien sind Leuchtkäfer und Glühwürmchen die bekanntesten lichtemittierenden Organismen. STREHLER und TOTTER (1952) beschrieben die erste Anwendung der Biolumineszenz in vitro zur Bestimmung von Stoffwechselzwischenprodukten. Die Autoren arbeiteten mit Extrakten aus dem Leuchtorgan des Glühwürmchens *Photinus pyralis*, um ATP und einige im Stoffwechsel damit verknüpfte Substrate und Enzyme zu bestimmen. Die Methode beruht auf der Entdeckung von McELROY (1947), daß wässrige Extrakte aus dem

Leuchtorgan des Glühwürmchens durch Zusatz von ATP erneut Licht emittieren. Die Reaktion beruht auf zwei aus dem Leuchtorgan extrahierbaren Komponenten, nämlich dem heterozyklischen Phenol Luciferin und dem Enzym Luciferase. Für die Lichtemission ist außer ATP und Sauerstoff ein zweiwertiges Kation, z.B. Magnesium notwendig (STREHLER, 1974).

Durch das Biolumineszenzverfahren erweitern sich die Möglichkeiten, in biologischen Systemen AMP, ADP und ATP nachzuweisen beträchtlich. Es liegen bereits eine Reihe von Arbeiten vor, die den Einsatz der Methode beschreiben. Als Beispiele seien die ATP-Bestimmung im Blutplasma (HOLMSEN et al., 1966), in menschlichem Urin, (JOHNSON et al., 1970), in Milch (BOSSUYT, 1978; WALSER et al., 1978; BRUNNER, 1979) und in Bakterien (COLE et al., 1967) genannt.

2.2.1.2. Prinzip und Meßbedingungen

Die Biolumineszenzreaktion läuft in zwei Teilschritten ab (Abb. 4). Luciferin reagiert mit ATP und Luciferase in Anwesenheit von Magnesiumionen unter Bildung von Adenyl-luciferin und Pyrophosphat. Durch Abspaltung eines Protons kann der Adenyl-luciferin-Komplex molekularen Sauerstoff binden. Es entsteht Adenyl-oxyluciferin und gleichzeitig erfolgt die Lichtemission. Die erste Teilreaktion ist reversibel, die zweite irreversibel. Adenyl-oxyluciferin wirkt kompetitiv hemmend auf die Lumineszenzreaktion. Pro oxydiertes Luciferinmolekül entsteht unter optimalen Bedingungen ein Lichtquant.

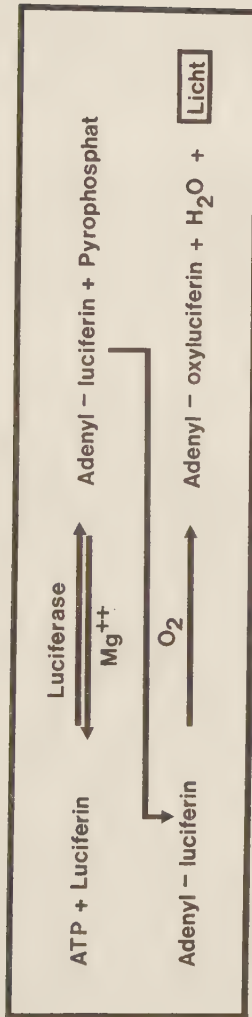


Abb. 4 : Biolumineszenzreaktion (STREHLER, 1974)

Die Gesamtreaktion erreicht innerhalb weniger Sekunden ihre Maximalgeschwindigkeit und wird langsamer, wenn ATP verbraucht wird oder Inhibitoren entstehen (STREHLER, 1974).

Die Reaktion beginnt bereits während des Vermischens einer ATP-haltigen Probe mit der Luciferin-Luciferase-Lösung. Da eine gewisse Zeit bis zur Messung vergeht, bestimmt man die relative Intensität des Lichtes einige Sekunden nach dem Probenansatz.

2.2.1.3. Die Messung beeinflussende Faktoren

Bei verschiedenen Anwendungen des Biolumineszenzsystems sind eine Reihe von Störfaktoren bekannt geworden, welche die Lumineszenzreaktion beeinträchtigen können.

Als enzymatische Reaktion ist das Verfahren von der Temperatur und vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig. Das Temperaturoptimum liegt bei 23°C, die maximale Lichtemission wird bei einem pH-Wert von 7,8 erreicht, wenn ein Glycin- oder Phosphatpuffer verwendet wird (GREEN und McELROY, 1956).

Außerdem wird die Reaktion von verschiedenen Ionen beeinflusst. Vor allem einwertige Kationen, wie Natrium und Kalium, aber auch Kalzium- und Chloridionen können die Reaktion hemmen (ALEDORT et al., 1966; DENBURG und McELROY, 1970; GILLES et al., 1976).

Als weitere Störquelle werden von STREHLER (1974) hydrolysierende Enzyme im Untersuchungsmaterial, beispielsweise ATP-asen, genannt.

Bei der Lumineszenzbestimmung muß darauf geachtet werden, daß die Testansätze bei total abgedunkelter Reaktionskammer im Meßgerät gemessen werden, um eine Überbelichtung durch Fremdlicht, sog. "Quenching", zu vermeiden.

Um störende Faktoren zu korrigieren, wird dem Testansatz nach der Bestimmung der in ihm enthaltenen ATP-Menge eine bekannte Menge ATP zugesetzt. Der Gehalt der Probe wird dann auf diesen internen Standardwert bezogen (STREHLER, 1974).

2.2.1.4. Reaktionskinetik der ATP-Messung

Bei Untersuchungen über den Ablauf von Biolumineszenzreaktionen hat sich ergeben, daß bei raschem Vermischen einer reinen ATP- und einer Luciferin-Luciferase-Lösung bereits nach 25 Millisekunden eine Lichtemission stattfindet. Nach insgesamt 0,3 Sekunden erreicht die Reaktion ihr Maximum und fällt dann kontinuierlich ab (DeLUCA und McELROY, 1974).

Die Reaktionskinetik bei Milch als ATP-haltigem Substrat zeigte im Prinzip einen ähnlichen, jedoch weitaus langsameren Reaktionsverlauf. Das spezifische Maximum der Kurve schwankte zeitlich zwischen 12 Sekunden und 3,5 Minuten und richtete sich nach der im Testansatz vorhandenen Zellzahl. In verschiedenen Milchproben war über einen Zeitraum von 15 bis 30 Minuten nach Reaktionsansatz Lumineszenz nachweisbar (BRUNNER, 1979).

Als Erklärung für den langsamen Reaktionsverlauf konnten nur Vermutungen angestellt werden. Entweder

wurde ATP nicht aus allen Zellen gleichzeitig freigesetzt oder es wurde zusätzlich Lumineszenz von anderen Reaktionen oder Molekülen gemessen (BRUNNER, 1979).

2.2.2. ATP-Bestimmung im Sperma mittels Biolumineszenz

BRACKETT und WILLIAMS (1967) bestimmten erstmals quantitativ ATP im Sperma verschiedener Spezies mit dem Biolumineszenzverfahren. Sie arbeiteten mit Rohextrakten aus *Photinus pyralis* und einem "Photovolt multiplifier Photometer". Die Spermien wurden zunächst in kalziumfreiem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer gewaschen und dann wurde durch 5 Minuten langes Erhitzen auf 100°C bei neutralem pH-Wert ATP freigesetzt.

Der ATP-Nachweis gelang im Sperma von Hengst, Eber, Bulle, Rüde, Kaninchenbock, Hahn und Mann. Auch im Samenplasma war - mit Ausnahme von Hengst und Eber - ATP nachweisbar.

BROOKS (1970b) untersuchte den ATP-Gehalt von Bullenspermien mit dem Luciferin-Luciferase-System. Die Messungen wurden mit einem Szintillationsspektrometer nach der von STANLEY und WILLIAMS (1969) beschriebenen Methode durchgeführt.

Zunächst überprüfte BROOKS zwei verschiedene ATP-Extraktionsmethoden durch radioaktive Markierung von ATP mit ^{14}C . Bei der ersten Methode wurde zu 1 ml Sperma 1 ml 20 %-ige, eisgekühlte Trichloressigsäure zugegeben und bis zur Messung mit einem Mixer bei Zimmertemperatur kontinuierlich gemischt.

Bei der zweiten Methode wurde derselbe Ansatz in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zusammen mit 1 ml tiefgefrorener Trichloressigsäure zu Puder zerkleinert. Nach dem Auftauen wurde mit Wasser suspendiert und bei $35.000 \times g$ und einer Temperatur von -2°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Bis zur Messung wurden die Proben bei -15°C tiefgefroren. Beide Methoden ergaben keinen signifikanten Unterschied in bezug auf extrahiertes ATP aus der Spermaprobe, es wurde daher mit der einfacheren Methode gearbeitet.

Im weiteren wurde ein Einfluß des Waschvorgangs auf den ATP-Gehalt im Sperma festgestellt. Nach der Zentrifugation war der ATP-Wert der Probe wesentlich niedriger als vorher. Nach Resuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit Fruktosezusatz wurde der ursprüngliche Wert annähernd erreicht.

ATP-Bestimmungen über einen Zeitraum von zwei Stunden mit fruktosehaltigen Pufferlösungen und solchen ohne Fruktose als Suspensionsmedium sowie unter aeroben und anaeroben Bedingungen zeigten, daß in Abwesenheit von glykolyisierbaren Zuckern unter anaeroben Verhältnissen ein deutlicher ATP-Abfall eintritt. Der ATP-Gehalt in der Probe blieb konstant, wenn Fruktose im Suspensionsmedium war oder aerobe Verhältnisse vorherrschten.

Der ATP-Gehalt im Sperma von Bulle, Schafbock, Hengst und Eber zeigte erhebliche Speziesunterschiede. Die absoluten ATP-Werte pro 10^9 Spermien lagen beim Schafbock am höchsten, beim Bullen und Hengst etwa halb so hoch und beim Eber am niedrigsten. Individuelle Unterschiede waren durch den

unterschiedlichen Anteil toter Spermien in den Ejakulaten bedingt (BROOKS, 1971).

HOSKINS (1973) bestimmte die Fruktolyserate und den ATP-Gehalt testikulärer und ejakulierter Bullenspermien. Die Stimulation der Fruktolyse durch Koffein und cyclisches AMP erhöhte die Motilität der Spermien, gleichzeitig fiel jedoch der ATP-Gehalt in der Probe. Dies läßt darauf schließen, daß bei zunehmender Spermienmotilität der ATP-Gehalt der Spermienzellen abnimmt.

ROGERS und MORTON (1973) fanden mit der von BRACKETT und WILLIAMS (1967) beschriebenen Methode, daß im Laufe der in-vitro-Kapazitation von Hamsterspermien der ATP-Gehalt auf 1/4 bis 1/5 des Wertes von Kontrollspermien absank, während sich die Motilität erhöhte. Die Reduktion des ATP-Gehalts war nicht durch externe ATP-asen, sondern durch die im umgebenden Medium enthaltene, niedermolekulare Humanserumfraktion bedingt. Die Autoren vermuteten deshalb, daß unter den Verhältnissen der Spermienkapazitation keine direkte Beziehung zwischen ATP-Gehalt und Spermienmotilität bestehe.

PRINZEN (1977) untersuchte den ATP-Gehalt frischer und tiefgefrorener Bullenspermien mit dem Biolumineszenzsystem. Als Meßgerät verwendete er einen LUMAC-Celltester M 1020. Die ATP-Extraktion erfolgte durch ein "nucleotid releasing reagent" (NRS^R-LUMAC). Verschiedene Auftautemperaturen erbrachten unterschiedliche ATP-Werte. Der höchste Gehalt wurde nach 15 Sekunden langem Auftauen bei 50°C erzielt.

Bei mit Ringer-Fruktose-Phosphat-Puffer verdünnten, frischen Spermaproben fiel der ATP-Gehalt bei Zimmertemperatur nach 90 Minuten, bei 38°C schon nach 30 Minuten deutlich ab. Der ATP-Gehalt pro mm³ Sperma war mit der Vorwärtsbeweglichkeit der jeweiligen Spermaprobe positiv korreliert.

Mit dem gleichen Meßsystem fanden FOULKES und Mac DONALD (1979) eine positive Korrelation der ATP-Werte von ejakulierten und tiefgefrorenen Bullenspermien zur Motilität ($r = 0,652$; $p < 0,01$ und $r = 0,466$; $P < 0,001$). Im Samenplasma war kein ATP nachweisbar.

2.2.3. ATP-Gehalt im Sperma

Seit MANN (1945a) zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt im Sperma und Spermienmotilität andeutete, gab es eine Reihe von Arbeiten, in denen der ATP-Gehalt im Sperma von verschiedenen Tierarten mit analytischen Verfahren bestimmt wurde (Tab. 1).

Die Ergebnisse der einzelnen Autoren lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen, da verschiedene Meßmethoden angewendet wurden. Außerdem wurde der ATP-Gehalt im Sperma von MANN (1945b), VOGLMAYR et al. (1967) und BROOKS (1970a) auf 10⁹ Spermien und von NEWTON und ROTHSCCHILD (1961) auf ein Spermium bezogen. HORVATH und SOLYMOSS (1953) drücken den ATP-Gehalt in mg% aus. Diese Bezugsgröße ist nicht mit den anderen Werten vergleichbar.

MANN (1945a und 1945b), NEWTON und ROTHSCCHILD (1961) sowie VOGLMAYR et al. (1967) vermuteten bereits einen Zusam-

menhang zwischen dem ATP-Gehalt der Spermien und der Spermienmotilität.

HORVATH und SOLYMOSS (1953) fanden eine Beziehung zwischen dem Befruchtungsvermögen des Spermas und dem ATP-Gehalt im Samenplasma. Bei qualitativ gutem Sperma waren 7 - 11 mg% ATP im Seminalplasma, bei schlechtem Sperma weniger als 3 mg%.

Neben den mit analytischen Methoden bestimmten ATP-Werten liegen auch Ergebnisse von ATP-Bestimmungen mit dem Biolumineszenzverfahren vor. Als Meßgeräte wurden verschiedene, modifizierte Photometer verwendet. Dabei kamen unterschiedliche Methoden der ATP-Extraktion aus der Spermienzelle zur Anwendung (Tab. 2).

Trotz unterschiedlicher Meß- und Extraktionsmethoden liegen die ATP-Werte bei Bestimmungen mit analytischen Verfahren und der Biolumineszenzmethode etwa in der gleichen Größenordnung (Tab. 1 und 2).

Die Werte schwanken beim Bullen zwischen 8 und 20 - 30 nmol pro 10^8 Spermien. Einen höheren Wert von $76,5 \pm 38,21$ nmol errechneten FOULKES und Mac DONALD (1979) aus ihren Meßergebnissen. Beim Schafbock liegen die Werte mit 16,4 - 29,1 nmol/ 10^8 Spermien im Mittel am höchsten. Im Hengstsperma wurden ATP-Werte zwischen 3,7 und 17,6 nmol pro 10^8 Spermien bestimmt. Beim Eber schwankt der ATP-Gehalt zwischen 5,1 und 19,4 nmol/ 10^8 Spermien. Beim Kaninchenbock liegt der Wert am niedrigsten (4,2 nmol/ 10^8 Spermien).

Tabelle 1: ATP-Gehalt in den Spermien einiger Haustierarten

Tierart	ATP-Gehalt in nmol/10 ⁸ Spermien*	Messmethode	Autor
Bulle	12,9	UV-Extinktion	NEWTON u. ROTHCHILD (1961)
	11,1	Säureextraktion, chromatographische Bestimmung	BROOKS (1970a)
	20 - 30	Spektrophotometrische Hexokinasebestimmung	GARBERS et al. (1973a)
Schafbock	16,4	Enzymatische Bestimmung d. Hydrolyserate	MANN (1945b)
	22,5	UV-Extinktion	VOGLMAYR et al. (1967)
	20,6	Säureextraktion, chromatographische Bestimmung	BROOKS (1970a)
Hengst	3,7	Säureextraktion, chromatographische Bestimmung	BROOKS (1970a)
Eber	11,7	Säureextraktion, chromatographische Bestimmung	BROOKS (1970a)
	19,4	Spektrophotometrische Hexokinasebestimmung	GARBERS et al. (1973b)

*: alle Werte wurden auf nmol/10⁸ Spermien umgerechnet

Tabelle 2: ATP-Bestimmung in Spermien mit dem Biolumineszenzverfahren

Tierart	ATP-Gehalt in nmol/10 ⁸ Spermien*	Extraktionsmethode	Autor
Bulle	8	Hitzeextraktion	BRACKETT u. WILLIAMS (1967)
	14,5	Säureextraktion	BROOKS (1971)
	5,52 ± 1,72***	NRS ^R -Extraktion (LUMAC)	PRINZEN (1977)
	76,5 ± 38,21	NRS ^R -Extraktion (LUMAC)	FOULKES u. MacDONALD (1979)
Schafbock	29,1	Säureextraktion	BROOKS (1971)
Hengst	11	Hitzeextraktion	BRACKETT u. WILLIAMS (1967)
	17,6	Säureextraktion	BROOKS (1971)
Eber	17,8	Hitzeextraktion	BRACKETT u. WILLIAMS (1967)
	5,1	Säureextraktion	BROOKS (1971)
Kaninchenbock	4,2	Hitzeextraktion	BRACKETT u. WILLIAMS (1967)
Hamster	50	Hitzeextraktion	ROGERS u. MORTON (1973)

* die Werte wurden auf nmol/10⁸ Spermien umgerechnet
 *** ng/mm³ Sperma

2.2.4. Beeinflussung des ATP-Gehalts im Sperma

Der im Sperma nachweisbare ATP-Gehalt ist unter anderem von den Meßbedingungen abhängig. Eine zusätzliche Beeinträchtigung ist zu erwarten, wenn in den Proben ATP vor der Bestimmung enzymatisch gespalten oder durch andere Reaktionen gebunden wird. Im Samenplasma sind ATP-hydrolysierende Enzyme enthalten (MANN, 1964). In den freien Protoplasmatröpfchen sind ebenfalls Enzyme nachgewiesen worden, die ATP abbauen können. DOTT und DINGLE (1968) isolierten neben anderen eine alkalische Phosphatase sowie eine 5-Nucleotidase.

BAVDEK und GLOVER (1970) berichten über eine vergleichsweise extrem hohe Konzentration von alkalischer Phosphatase in den Protoplasmatröpfchen beim Kaninchen.

Einen direkten Einfluß der Protoplasmatröpfchen auf den ATP-Gehalt von Bullenspermien beschreibt HASSAN (1979). Durch Zugabe einer Protoplasmatröpfchensuspension zu gewaschenen Spermien fiel der ATP-Gehalt von $106 \mu\text{g pro } 10^9$ Spermien in der Kontrollprobe auf $80 \mu\text{g pro } 10^9$ Spermien in der Probe mit Protoplasmatröpfchenzusatz. Gleichzeitig verbesserte sich die Motilität in den Proben mit Protoplasmatröpfchen gegenüber den Proben ohne freie Protoplasmatröpfchen.

Im Bullenseminaleplasma konnte von GLANDIGAU und RUHENSTROTH-BAUER (1974) ein basisches Protein (BBSP) nachgewiesen werden, das in der Lage war, ATP zu binden. Freies ATP wurde in einer mit BBSP versetzten physiologischen Kochsalzlösung bei verschiedenen

Temperaturen inkubiert. Während bei 37°C nach 5 Minuten mit einem enzymatischen Schnelltest kein ATP mehr nachweisbar war, konnte bei Zimmertemperatur nach 30 Minuten eine geringe Menge wiedergefunden werden. Die Autoren vermuten, daß es sich um eine elektrostatische Bindung von gelöstem ATP handelte.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methode

3.1.1. Versuchstiere und Spermagewinnung

Als Versuchstiere standen 6 Bullen (Deutsches Fleckvieh), 2 Schafböcke (Merinolandschaf), 2 Ziegenböcke (Deutsche bunte Edelziege), 1 Hengst (Traber), 2 Eber (Deutsche Landrasse) und 1 Kaninchenbock (Weißer Neuseeländer) zur Verfügung. Alle Tiere waren gesund, Geschlechtsorgane und -funktionen waren ohne Besonderheiten.

Bei allen Spezies wurde die Spermagewinnung mit Hilfe einer künstlichen Scheide durchgeführt. Als Deckpartner diente bei Bulle, Schaf- und Ziegenbock ein anderes männliches Tier derselben Spezies, bei Hengst, Eber und Kaninchenbock ein Phantom.

Da für die Untersuchungen nur eine geringe Spermamenge notwendig war, wurde jeweils nur ein Ejakulat gewonnen, so daß für die Versuche Erstejakulate verwendet wurden.

3.1.1.1. Voruntersuchung der Ejakulate

Unmittelbar nach der Spermagewinnung wurden die Ejakulate auf einwandfreie Beschaffenheit überprüft. Die Untersuchung erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

I. Makroskopisch

Volumen, Farbe, Konsistenz

II. Mikroskopisch

- Motilitätsschätzung (bei 38°C)
 - Massenbewegung
 - Ortsbewegung in %
 - Vorwärtsbewegung in %
- Dichtebestimmung (Zählkammer nach TÜRK, Anzahl der Spermien/mm³)
- Lebend-Tot-Färbung (mit Bromphenolblau, 300 Spermien ausgewertet)

Nach den Voruntersuchungen wurden die Ejakulate nativ oder verdünnt bis zur ATP-Bestimmung bei Zimmertemperatur gelagert. Für die Versuche mit gewaschenen Spermien erfolgte unmittelbar nach den Voruntersuchungen die Zentrifugation. In der Regel wurden die Lumineszenzmessungen innerhalb von 30 Minuten nach der Samengewinnung vorgenommen.

3.1.1.2. Meßgeräte und Reagenzien zur ATP-Bestimmung

Die ATP-Bestimmungen wurden mit zwei verschiedenen Lumineszenzphotometern* durchgeführt. Das Prinzip dieser Geräte basiert darauf, daß das bei der Lumineszenzreaktion emittierte Licht über einen Detektor (Photomultiplier oder Photodiode) und einen Signalverstärker in elektrischen Strom umgewandelt wird.

* Celltester M 1030 LUMAC Systems AG, Zolder, Belgien
Luminometer 1250 LKB-Wallac Producter AB, Turku, Finnland

Das Meßergebnis wird entweder digital angezeigt oder durch einen Schreiber aufgezeichnet. Die Messung erfolgt in einer abgedunkelten Reaktionskammer, nachdem die Probe mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz vermischt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein LUMAC-Celltester M 1030 und ein LKB-Wallac-Luminometer 1250 verwendet.

Der LUMAC-Celltester war mit Digitalanzeige und einem automatischen Luciferin-Luciferase-Dispensiergerät ausgestattet. Als Einheit für die angezeigten Werte werden RLU (Relative Light Units) angegeben. Das Gerät bietet für den Meßvorgang zwei Variationsmöglichkeiten. Entweder werden die abgegebenen Lichtimpulse alle 2,4 Sekunden digital (Einstellung SIGNAL) oder ein integrierter Endwert nach 5, 10 bzw. 40 Sekunden (Einstellung INTEG) angezeigt. Der SIGNAL-Meßmodus eignet sich für die Überprüfung von Reaktionsabläufen, Modus INTEG für die Berechnung des absoluten ATP-Gehalts einer Probe aus den angezeigten RLU-Werten.

Das LKB-Wallac-Gerät "Luminometer" war mit einem 1-Kanal-Flachbrettschreiber (LKB-Wallac-Potentio-meter) ausgerüstet, bei dem je nach Testansatz verschiedene Laufgeschwindigkeiten eingestellt werden konnten. Der Schreiber reagierte auf Impulse von 1 - 10.000 mV. Bei jeder Messung wurde die Reaktionskinetik aufgezeichnet.

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Geräteherstellern bezogen. Die Luciferin-Luciferase-Reagenzien enthalten gereinigte Extrakte aus *Photinus pyralis* und werden als Trockensubstanz geliefert.

Für die Messungen im Celltester wurde in 5 ml HEPES-Mg-Puffer gelöstes LUMIT^R (LUMAC), im Luminometer in 10 ml Aqua dest. gelöstes "ATP Monitoring Reagent" (AMR-LKB-Wallac) verwendet.

Die ATP-Standardlösungen zur Eichung und internen Standardisierung wurden ebenfalls als Trockensubstanz geliefert und mußten kurz vor Meßbeginn in sterilem Aqua dest. aufgelöst werden. Der LUMAC-Standard wurde in 2 ml, der LKB-Wallac-Standard in 10 ml aufgelöst, um jeweils 10^{-5} molare ATP-Standardlösungen zu erhalten. Nach dem Auflösen sind die Standardlösungen bei -20°C über mehrere Wochen haltbar. Während der Messung standen die Standardlösungen in einem Eisbad, da ATP in derart geringen Konzentrationen bei höheren Temperaturen instabil ist, was zu Aktivitätsverlusten innerhalb weniger Stunden führen kann.

Zur Messung im Celltester und im Luminometer wurden die Proben sowie die Reagenzien mit EPPENDORF-Pipetten - entsprechend dem jeweiligen Volumen - in eine runde Plastikkuvette (10 x 55 mm) pipettiert, durch erneutes Aufsaugen oder Schütteln gemischt, und anschließend gemessen. Beim LUMAC-System wurden 100 μl des Luciferin-Luciferase-Gemisches (LUMIT^R) automatisch durch den eingebauten Dispenser zugegeben.

Die ATP-Freisetzung aus der Zelle erfolgt bei der LUMAC-Methode durch eine NRS^R-Substanz ("Nucleotid Releasing Reagent"). Das nicht näher definierte Reagenz soll die Zellmembran für kleine Moleküle wie ATP permeabel machen.

Beim LKB-Wallac-System wird zur ATP-Extraktion, ähnlich wie bei der ATP-Freisetzung aus Gewebekulturen, 0,1 molarer Tris-Acetat-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 7,75 zugegeben.

Die Probenansätze wurden in folgender Reihenfolge pipettiert:

Celltester

Probe + gleiches Volumen NRS^{R} + 100 μl LUMIT^{R} *

Luminometer

200 μl AMR *** + 800 μl Tris-EDTA-Puffer + Probe

Die Messungen erfolgten im Celltester nach 10 Sekunden langem Vermischen von Probe und NRS^{R} unmittelbar nach Zugabe des LUMIT^{R} .

Für die Messungen im Luminometer wurde die Probe mit den Reagenzien (AMR + Puffer) 20 Sekunden lang vermischt.

Beim Celltester war der Meßbeginn somit mit dem Beginn der Lichtemission gekoppelt und es wurde ein integrierter Endwert nach 10 Sekunden abgelesen, während beim Luminometer die Messung erst 20 Sekunden nach Reaktionsbeginn erfolgte und der weitere Reaktionsverlauf mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde.

* automatische Zugabe nach Betätigung des Startknopfes

*** AMR = "ATP Monitoring Reagent" (LKB-Wallac)

3.1.2. Vorversuche zur ATP-Bestimmung im Sperma

3.1.2.1. Bestimmung des Meßbereichs für Spermaproben; Meßmodus

3.1.2.1.1. Celltester

Der Celltester reagiert nach Angabe des Herstellers mit einer Empfindlichkeit von 40×10^{-15} mol ATP und erlaubt Messungen über einen Bereich von 4,5 Dekaden.

Um mit Sperma in den Meßbereich zu kommen, wurden zunächst unverdünnte Spermaproben der Spezies Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein und Kaninchen untersucht. Um den für die untersuchten Tierarten geeigneten Meßbereich herauszufinden, wurden zusätzlich Verdünnungsreihen (1:1; 1:5; 1:10; 1:30 und 1:100) von den Spermaproben aller Tierarten, mit Ausnahme des Kaninchens, hergestellt. Verdünnungsmedium war 0,9 %-ige physiologische Kochsalzlösung. Dabei wurde das Probenvolumen ursprünglich für alle Spezies nach den Angaben des Geräteherstellers gewählt (50 μ l). Nach einigen Testansätzen zeigte sich, daß für Sperma von Tierarten mit hoher Konzentration an Spermien (Wiederkäuer) ein kleineres Volumen von 30 μ l bessere Resultate erbrachte. Es wurde deshalb folgender Modus für die weiteren Messungen festgelegt:

30 μ l Probe + 30 μ l NRS^R + 100 μ l LUMIT^R bei Wiederkäuersperma

50 μ l Probe + 50 μ l NRS^R + 100 μ l LUMIT^R bei Hengst-, Eber- und Kaninchenbocksperma

Vorversuche zur Mischzeit von Probe und NRS^R-Reagenz zur Freisetzung des ATP ließen bei Mischzeiten von 5, 10, 20 und 30 Sekunden keinen Einfluß auf das Meßergebnis erkennen. Es wurde deshalb - wie vom Hersteller angegeben - nach 10 Sekunden gemessen.

Da bei den Messungen im Celltester das NRS^R-Volumen immer gleich dem Probenvolumen und das LUMIT^R-Volumen konstant 100 µl war, werden in den weiteren Abschnitten die Volumina für diese Reagenzien nur mehr aufgeführt, wenn von diesem Grundsatz abgewichen wurde.

3.1.2.1.2. Luminometer

Bei ATP-Bestimmungen im Luminometer liegt die minimal meßbare ATP-Menge bei weniger als 4×10^{-12} mol. Der Gehalt einer Probe sollte nach den Herstellerangaben zwischen 10^{-11} und 10^{-6} mol ATP liegen.

Über dieses Meßgerät liegen noch keine Angaben zur Messung von Sperma vor. Allgemein sollte das Gesamtvolumen des Testansatzes (Probe und Reagenzien) nicht weniger als 200 µl und nicht mehr als 2 ml betragen. Um mit Spermaproben in den Meßbereich des Gerätes zu kommen und gleichzeitig unverdünnte Proben messen zu können, wurde folgender Meßmodus gewählt:

200 µl AMR + 800 µl Tris-EDTA-Puffer + 5 (10) µl Probe

Das kleinere Probenvolumen bezieht sich auf die Spezies mit relativ dichtem Sperma (Wiederkäuer), das größere auf Tierarten mit relativ dünnem Sperma (Hengst, Eber). Bei Kaninchenbocksperma betrug das Probenvolumen 50 μl .

Einige Testansätze ließen einen Einfluß der Mischzeit von Probe und Reagenzien erkennen. Bei vier Meßreihen mit Sperma von zwei verschiedenen Bullen und Mischzeiten von 5, 10, 20 und 30 Sekunden ergab sich, daß bei einer Mischzeit von 20 Sekunden die höchste Lumineszenz erreicht wurde. In allen weiteren Versuchen wurde daraufhin bei Spermaproben nach einer Mischzeit von 20 Sekunden gemessen.

3.1.2.2. Bestimmung der Reproduzierbarkeit bei der Messung von Standardansätzen und Spermaproben

Voraussetzung für den Einsatz einer Meßmethode ist die Wiederholbarkeit der Ergebnisse. Zur Überprüfung der Methode wurden jeweils 5 Testansätze einer 10^{-5} molaren ATP-Standardlösung in beiden Geräten unter gleichen Bedingungen nach folgendem Modus gemessen:

Celltester

10 μl ATP-Standard (0,1 nmol) + 90 μl Aqua dest. + LUMIT^R

Luminometer

AMR + Puffer + 10 μl ATP-Standard (0,1 nmol)

Das Gesamtvolumen der Proben entsprach damit bei beiden Geräten dem üblichen Ansatz.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Sperma-messungen wurde die Lumineszenz von unverdünnten und verdünnten Spermaproben sowie von gewaschenen Bullenspermien bestimmt; und zwar wurden aufgrund des unterschiedlichen Meßbereichs die Nativproben im Luminometer, die verdünnten Proben im Celltester gemessen. Für gewaschene Spermien wurden in beiden Geräten Meßwerte ermittelt. Je 5 Messungen unter gleichen Bedingungen waren die Grundlage für die Auswertung. Als Verdünner diente CUE-Tris-Verdünner (PAUFLER, 1974) mit einer Temperatur von 25°C, die Verdünnung war 1:30 und erfolgte tropfenweise. Für die Messung gewaschener Spermien wurden die Ejakulate bei 3.000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand mit einer Plastik-Einmalspritze abgesaugt und das Sediment mit CUE-Tris-Verdünner auf das Ausgangsvolumen resuspendiert. Für die Messungen im Celltester wurde die Probe auf eine Spermien-dichte zwischen 30.000 und 50.000 Spermien/mm³ weiterverdünnt, um in den Meßbereich des Gerätes zu kommen.

Meßmodus:

Celltester

30 µl Probe + NRS^R + LUMIT^R

Luminometer

AMR + Puffer + 5 µl Probe

Zur Errechnung des Variationskoeffizienten wurden beim Celltester integrierte Endwerte nach 10 Sekunden, beim Luminometer die maximale Lumineszenz nach konstanter Mischzeit von Reagenzien und Probe, herangezogen.

3.1.2.3. Erstellung der Eichkurve und interne Standardisierung

Grundlegend für die Errechnung des ATP-Gehalts einer Probe aus den von den Meßgeräten angezeigten Werten ist die Erstellung einer Eichkurve. Da die Aktivität der Luciferin-Luciferase-Substanz nach Auflösung in Aqua dest. bzw. HEPES-Mg-Puffer nur über einen begrenzten Zeitraum von etwa 9 Stunden konstant bleibt, sollten zumindest an jedem Meßtag einige Eichwerte bestimmt werden.

Es lag nahe, auch unterschiedliche Chargen von Luciferin-Luciferase- und ATP-Standardlösungen zu überprüfen, da von WALSER et al. (1978) berichtet wird, daß das System noch nicht standardisiert sei. Ein linearer Verlauf der Eichkurven ist die Voraussetzung jeglicher Umrechnung auf den ATP-Gehalt pro Probe.

Zur Erstellung von Eichkurven wurden jeweils Testansätze von 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l und 100 μ l einer 10^{-5} molaren ATP-Standardlösung nach dem in Abschnitt 3.1.2.2. beschriebenen Modus in beiden Geräten gemessen. Im Celltester wurde das Aqua dest.-Volumen so reduziert, daß jeder Testansatz ein konstantes Gesamtvolumen von 200 μ l hatte. Beim Luminometer konnte

darauf verzichtet werden, da bei dem relativ hohen Gesamtvolumen von über 1 ml pro Testansatz kein Volumeneinfluß zu erwarten war.

Um den Verlauf der Eichkurve über einen größeren Meßbereich zu ermitteln, wurden darüber hinaus noch Eichwerte von 0,005; 0,01; 0,1; 1; 2 und 5 nmol ATP pro Probe im Luminometer mit Hilfe von Standardansätzen bestimmt.

Um Einflüsse von Temperatur, pH-Wert und Verdünnungsmedium auf das Lumineszenzsystem zu korrigieren, soll zusätzlich zur Eichkurve eine interne Standardisierung vorgenommen werden. Der interne Standardansatz unterscheidet sich von den Testansätzen dadurch, daß zusätzlich zur Probe (Ablesung A) eine bekannte Konzentration ATP-Standard zugegeben wird. Die ATP-Konzentration in der Probe wird dadurch erhöht, und das Meßgerät zeigt einen höheren Wert an (Ablesung B). Der ATP-Gehalt der Probe kann dann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{ATP/Probe} = \frac{\text{ATP-Standard} \times \text{Ablesung A}}{\text{Ablesung B} - \text{Ablesung A}}$$

$$\text{Beispiel} : \frac{0,1 \text{ nmol} \times 100 \text{ RLU}}{120 \text{ RLU} - 100 \text{ RLU}} = 0,5 \text{ nmol}$$

Beim Celltester muß für die innere Standardisierung ein neuer Ansatz pipettiert werden, beim Luminometer kann in die schon angesetzte Probe ein Standard zugegeben werden.

3.1.2.4. Bestimmung des Einflusses von Sperma- verdünnern auf das Lumineszenzsystem

Für die künstliche Besamung, für die Tiefgefrierkonservierung und für viele andere Untersuchungen muß das Sperma der einzelnen Tierarten verdünnt werden. Hierfür werden verschiedene Spermaverdünner verwendet. Aus diesem Grund sollte eine etwaige Beeinträchtigung der Lumineszenz durch die einzelnen Verdünnungsmedien geprüft werden. Als Spermaverdünner dienen 0,9 %-ige physiologische Kochsalzlösung, CUE-Tris-Verdünner (PAUFLER, 1974), Ringer-Phosphat-Puffer (MANN, 1964), HEPES-Medium (WEITZE, 1976) und Tris-Eidotter-Verdünner (FOOTE et al., 1960).

Die Lumineszenzbeeinflussung gegenüber einer ATP-Standardlösung wurde durch folgenden Meßmodus überprüft:

Celltester

10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + 30 µl Aqua dest. + LUMIT^R
10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + 30 µl Verdünner + LUMIT^R

Luminometer

AMR + Puffer + 10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + 10, 20 bzw.
100 µl Verdünner

3.1.3. ATP-Bestimmung im Sperma

3.1.3.1. Untersuchung der Reaktionskinetik bei der Messung von Spermaproben

Von allen untersuchten Tierarten wurden unverdünnte Spermaproben im Luminometer gemessen und die Reaktionskinetik mit dem Schreiber aufgezeichnet. Bei den verschiedenen Proben ergab sich ein unterschiedlicher Kurvenverlauf. Für jede Tierart mußte die Laufgeschwindigkeit des Schreibers der Schnelligkeit der Reaktionskinetik angepaßt werden und wurde dann für jede Spezies einheitlich gehalten.

Das Probenvolumen betrug bei Bullen-, Schafbock- und Ziegenbocksperma 5 μ l, bei Hengst- bzw. Ebersperma 10 μ l und bei Kaninchenbocksperma 50 μ l. Zuerst wurden die Reagenzien (AMR und Tris-EDTA-Puffer) und dann das Sperma in die Küvette einpipettiert. Die Küvette wurde genau 20 Sekunden lang geschüttelt, damit eine gute Durchmischung von Probe und Reagenzien stattfinden konnte.

In der Literatur ist ein reversibler Einfluß der Zentrifugation auf den ATP-Gehalt der Spermien beschrieben (BROOKS, 1970b). Aus diesem Grund und um den Einfluß des Samenplasmas auf den Reaktionsverlauf festzustellen, wurden gewaschene Spermien mit in die Untersuchung einbezogen. Die Ejakulate wurden 10 Minuten lang bei 3.000 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Plastik-Einmalsspritze abgehebert und das Sediment auf das Ausgangsvolumen mit HEPES-Medium (WEITZE, 1976) resuspendiert. Bei Kaninchenbocksperma gelang das Waschen durch einfache Zentrifugation nur unvollständig. Deshalb

wurden die Spermien nach der ersten Zentrifugation in HEPES-Medium plus 10 Volumenprozent Ficoll (Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt) suspendiert, nochmals bei $3.000 \times g$ 10 Minuten lang zentrifugiert und anschließend mit HEPES-Medium auf das Ausgangsvolumen resuspendiert.

Nach erneuter Dichtebestimmung, Motilitätsschätzung und Bestimmung des Anteils toter Spermien erfolgte die Messung im Luminometer nach dem gleichen Modus wie bei Nativproben. Die Reaktionskinetik wurde vom Schreiber aufgezeichnet.

3.1.3.2. Untersuchung des Einflusses von Samenplasma auf die ATP-Messung

Nachdem in verschiedenen Vorversuchen ein Einfluß des Samenplasmas auf die Messung erkennbar war, sollte geklärt werden, ob im Samenplasma ATP nachgewiesen werden kann und ob das Samenplasma die Lumineszenz von ATP-Standardlösungen beeinträchtigt. Dazu wurde Samenplasma der verschiedenen Tierarten zu ATP-Standardlösungen mit bekanntem ATP-Gehalt zugegeben. Als Vergleichswert diente derselbe Standard ohne Samenplasma.

Das Samenplasma wurde durch Zentrifugieren der Ejakulate bei $3.000 \times g$ gewonnen (s. 3.1.3.1.). Waren bei mikroskopischer Untersuchung des Plasmas noch Spermien sichtbar, so wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welche Bestandteile des Samenplasmas für die Beeinflussung der

Messung verantwortlich sind, wurde das Samenplasma 10 Minuten lang in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Das Plasma selbst hatte über einen Zeitraum von mindestens 8 Minuten eine Temperatur zwischen 90°C und 96°C .

Die Testansätze wurden wie nachfolgend durchgeführt:

Celltester (Bestimmung des ATP-Gehalts im Samenplasma)

$30\ \mu\text{l Samenplasma} + 30\ \mu\text{l NRS}^{\text{R}} + \text{LUMIT}^{\text{R}}$

Luminometer (Bestimmung des Einflusses von Samenplasma)

$\text{AMR} + \text{Puffer} + 10\ \mu\text{l ATP-Standard (0,1 nmol)} + 10\ \mu\text{l Samenplasma bzw. Samenplasma erhitzt}$

Für die Messungen im Luminometer wurden die Ansätze nach Zugabe des Samenplasmas 5 Sekunden lang durch Schütteln der Küvette gemischt, um eine homogene Durchmischung von ATP-Standard und Samenplasma zu erreichen.

3.1.3.2.1. Untersuchung über den Einfluß von nach Kastration (Bulle) bzw. Vasoligatur (Kaninchenbock) gewonnenem Samenplasma auf die ATP-Messung

Nachdem eine durch das Samenplasma bedingte Beeinträchtigung der ATP-Messung deutlich geworden war, erschien es interessant abzuklären, ob dieser Hemmeffekt auf Sekretionsprodukte von Hoden und Nebenhoden oder auf die Sekrete aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen zurückzuführen ist.

Zur Gewinnung von "reinem" Samenplasma wurde ein Altbulle nach Sedation (Rompun^R, 1 ml i.v.), Epidural- und Lokalanästhesie (Lidocain^R 2%, 5 bzw. 20 ml) kastriert. Bei einem Kaninchenbock wurden in Vollnarkose (Narcoren^R, 40 mg/kg), nach Eröffnung der Bauchdecke in der Linea alba, die Vasa deferentia vor der Einmündung in die Harnröhre unterbunden.

Von beiden Tieren wurden weiterhin Ejakulate mit der künstlichen Scheide gewonnen. Etwa 4 Wochen nach Kastration bzw. Vasoligatur waren die Ejakulate regelmäßig spermienfrei.

Das so gewonnene Samenplasma wurde nach dem in 3.1.3.2. beschriebenen Modus im Luminometer untersucht.

3.1.3.2.2. Untersuchungen über den Einfluß von freien Protoplasmatröpfchen auf die ATP-Messung

Die Protoplasmatröpfchen sind nach der hier durchgeführten Zentrifugation von Ejakulaten (s. 3.1.2.2.) ein Bestandteil des Samenplasmas und können somit am Seminalplasmaeinfluß auf die ATP-Messung beteiligt sein. So beschrieb HASSAN (1979) einen Abfall des ATP-Gehalts gewaschener Bullenspermien nach Zugabe einer Suspension von freien Protoplasmatröpfchen. Diese Untersuchungen wurden mit dem Celltester durchgeführt, so daß nur die integrierten Endwerte als Kriterium herangezogen werden konnten. Deshalb sollte nun mit dem Luminometer überprüft werden, ob freie Protoplasmatröpfchen eine ATP-Standardlösung beeinflussen können und in welcher Weise sie die Reaktionskinetik der ATP-Messung von gewaschenen Bullenspermien verändern.

Die Isolierung der freien Protoplastatröpfchen aus Bullenejakulaten erfolgte nach der von WEITZE (1976) beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation. Nach mehrmaligem Waschen der Spermien in HEPES-Waschmedium mit Ficoll-Zusatz (Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt) erhält man schließlich je ein Sediment aus Spermien und aus Protoplastatröpfchen. Das Spermien- und Protoplastatröpfchensediment wurde in Ringer-Fruktose-Phosphat-Puffer (HASSAN, 1979) suspendiert. Danach wurden 2 Ansätze gebildet:

Ansatz 1: 0,4 ml Spermien suspension + 0,4 ml Ringer-Fruktose-Phosphat-Puffer (RFPP)

Ansatz 2: 0,4 ml Spermien suspension + 0,4 ml Protoplastatröpfchensuspension

In beiden Ansätzen wurde die Motilität geschätzt und die Spermien dichte sowie die Dichte der Protoplastatröpfchen mit einer Zählkammer nach Türk ermittelt (HASSAN, 1979).

Um den Einfluß der freien Protoplastatröpfchen auf die Reaktionskinetik festzustellen, wurden nun Testansätze nach einer Mischzeit von 20 Sekunden im Luminometer gemessen:

Messung I: AMR + Puffer + 10 µl Ansatz 1

Messung II: AMR + Puffer + 10 µl Ansatz 2

Der Einfluß auf eine ATP-Standardlösung wurde dadurch überprüft, indem zu einem ATP-Standard eine Protomatröpfchensuspension zugegeben wurde. Als Vergleichsmessung diente ATP-Standardlösung mit RFPP-Zusatz.

Messung III: AMR + Puffer + 10 μ l ATP-Standard (0,1 nmol)
+ 10 μ l Protomatröpfchensuspension

Messung IV: AMR + Puffer + 10 μ l ATP-Standard (0,1 nmol)
+ 10 μ l Ringer-Fruktose-Phosphat-Puffer

Weiterhin wurde eine Messung, wie unter III beschrieben, mit einer vorher erhitzten (s. 3.1.3.2.) Protomatröpfchensuspension vorgenommen (Messung V).

3.1.3.3. Bestimmung des ATP-Gehalts ejakulierter und gewaschener Spermien der verschiedenen Spezies

Zum Vergleich mit den in der Literatur angegebenen, mit verschiedenen Meßmethoden bestimmten und teilweise widersprüchlichen ATP-Werten, sollte der absolute ATP-Gehalt von ejakulierten und gewaschenen Spermien der verschiedenen Tierarten bestimmt werden. Bei den bisher beschriebenen ATP-Bestimmungen mit dem Biolumineszenzsystem wurde mit verdünntem Sperma (PRINZEN, 1977; FOULKES und MacDONALD, 1979) oder gewaschenen Spermien gearbeitet (BRACKETT und WILLIAMS, 1967; BROOKS, 1970b und 1971).

Untersucht wurden die Ejakulate von 4 Bullen, 2 Schafböcken, 1 Ziegenbock, 1 Hengst, 2 Ebern und 1 Kaninchenbock. Nach der Spermagewinnung wurden die Ejakulate auf einwandfreie Beschaffenheit überprüft (3.1.1.1.) und, wie in 3.1.2.1. beschrieben, im Luminometer die Lumineszenz bestimmt. Für die Untersuchung gewaschener Spermien wurden die Ejakulate zentrifugiert (s. 3.1.3.1.) und anschließend nach dem gleichen Modus gemessen.

Da in toten Spermien kein ATP nachweisbar war (s. 3.2.2.3.), wurde der ATP-Gehalt einheitlich auf 10^8 lebende Spermien bezogen (Bestimmung mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbung - s. 3.1.1.1.).

Er wurde anhand des Maximums der Reaktionskurve und des Eichwertes von 0,1 nmol ATP-Standard (Endpunktbestimmung), der Dichte sowie des prozentualen Anteils lebender Spermien nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Lebende Spermien/Probe} = \frac{\text{Dichte x Prozentsatz lebender Spermien x Probenvolumen}}{100}$$

$$\text{ATP/Probe} = \frac{0,1 \text{ nmol ATP-Standard x Lumineszenz (Probe)}}{\text{Lumineszenz (Standard)}}$$

$$\text{ATP}/10^8 \text{ lebende Spermien} = \frac{\text{ATP/Probe} \times 10^8}{\text{lebende Spermien/Probe}}$$

Beispiel: Bullensperma; Spermiedichte: $900.000/\text{mm}^3$
Lebend-Tot-Färbung: 75 % der Spermien nicht
angefärbt ("lebend")
Maximale Lumineszenz der Probe: 400 mV
Probenvolumen: 5 μl
Lumineszenz des ATP-Standards (0,1 nmol): 180 mV

$$\text{Lebende Spermien/Probe} = \frac{900.000 \times 75 \times 5}{100} = 3,375 \text{ Mio.}$$

$$\text{ATP/Probe} = \frac{0,1 \text{ nmol} \times 400 \text{ mV}}{180 \text{ mV}} = 0,222 \text{ nmol}$$

$$\text{ATP}/10^8 \text{ lebender Spermien} = \frac{0,222 \text{ nmol} \times 10^8}{3,375 \times 10^6} = 6,6 \text{ nmol}$$

3.1.3.4. Untersuchung der Beziehung des ATP-Gehalts von Spermaproben zur Spermienmotilität sowie dem Anteil lebender Spermien

Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Spermien und der Spermienmotilität ergeben sich bereits aus dem Literaturstudium (PRINZEN, 1977; FOULKES und MacDONALD, 1979). Die Spermaproben waren dabei durch Verdünnen oder Tiefgefrieren vorbehandelt. Es sollte nun überprüft werden, ob eine Beziehung zwischen Spermienmotilität und ATP-Gehalt besteht, wenn die ATP-Bestimmung mit Nativsperma erfolgt. Dazu mußten parallel laufende Untersuchungen von ATP-Gehalt und Spermienmotilität über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Hierbei ergab sich folgende Schwierigkeit:

Wegen der Unterschiede in der Aktivität verschiedener Luciferin-Luciferase-Chargen mußte für die gesamte Untersuchung eine einheitliche Charge verwendet werden, um wirklich vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Aktivität der aufgelösten Reagenzien blieb jedoch maximal 9 Stunden stabil. Andererseits ist im Nativsperma bei Wiederkäuern während der Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von 9 Stunden nur ein geringer Motilitätsabfall zu erwarten. Deshalb wurde durch Lagerung der Spermaproben bei 39°C der Motilitätsabfall beschleunigt.

Von 3 Bullen und 2 Ebern wurden Ejakulate gewonnen und nach den in 3.1.1.1. beschriebenen Gesichtspunkten untersucht. Anschließend wurden Testansätze von 5 µl Bullensperma und 10 µl Ebersperma im Luminometer gemessen (Modus 3.1.2.1.).

Danach wurden jeweils 2 ml der Ejakulate in offenen Plastikröhrchen im Brutschrank bei 39°C gelagert. Bei den Bullenejakulaten wurde nach 1/2, 1, 2, 3, 4, 7 und 18 Stunden* Motilitätsschätzung, Lebend-Tot-Färbung und Lumineszenzmessung wiederholt. Dasselbe erfolgte bei den Eberejakulaten nach 1/2, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden.

Ebenso wurden 2 ml eines Eberejakulates bei Zimmertemperatur gelagert und die oben beschriebenen Untersuchungen wurden nach 2, 4, 6 und 8 Stunden durchgeführt.

Der ATP-Gehalt pro Probe errechnete sich nach der in 3.1.3.3. angegebenen Formel.

* Für die Messungen nach 18 Stunden wurde ein frisch aufgelöstes Reagenz (AMR) verwendet

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorversuche zur ATP-Bestimmung im Sperma

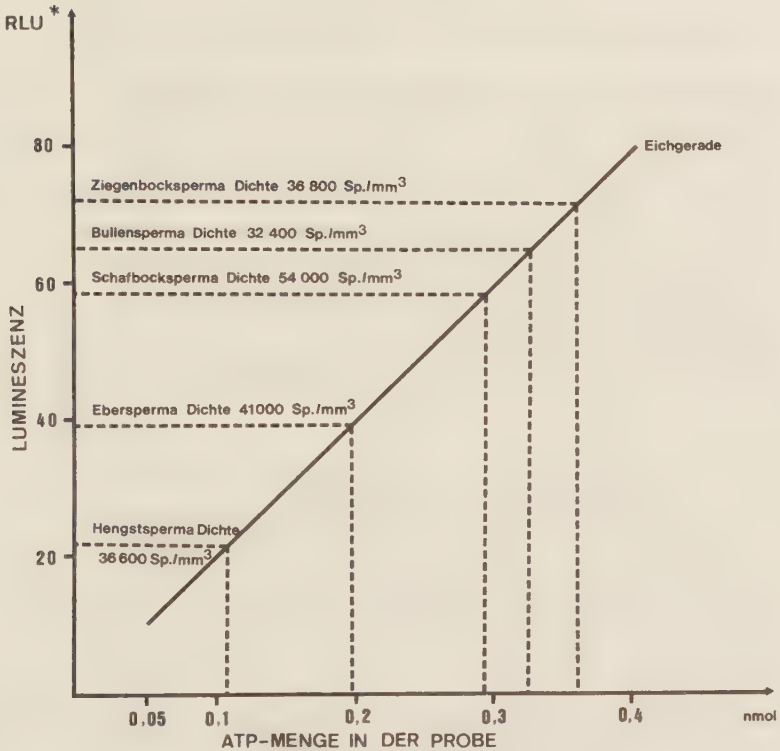
3.2.1.1. Meßbereich für Spermaproben

3.2.1.1.1. Celltester

Unverdünnte Spermaproben (50 μ l) von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber erbrachten Werte außerhalb des Meßbereichs (Anzeige "overflow"). Bei unverdünntem Kaninchenbocksperma war keine Lumineszenz nachweisbar (Digitalanzeige 0).

Der optimale Meßbereich (linearer Bereich der Eichkurve) wurde erreicht, wenn bei physiologischer Spermiedichte und -motilität 30 μ l einer im Verhältnis 1:100 verdünnten Schafbock- bzw. Ziegenbock-spermaprobe und eine im Verhältnis 1:30 verdünnte Bullenspermaprobe gemessen wurde. Ebersperma mußte 1:10 und Hengstsperma 1:5 verdünnt werden. Die Dichte der untersuchten Spermaproben nach der Verdünnung war bei Ziegenbocksperma 36.800, bei Schafbocksperma 54.000, bei Bullensperma 32.800, bei Ebersperma 41.000 und bei Hengstsperma 36.600 Spermien pro mm^3 . Aus den angeführten Beispielen (Abb. 5) kann gefolgert werden, daß man bei physiologischer Spermienmotilität und einer Spermienkonzentration nach der Verdünnung zwischen 15.000 und 50.000 Spermien/ mm^3 in den linearen Bereich der Eichkurve kommt.

Abb. 5: Meßbereich für Spermaproben (verdünnt) bei der Messung im Celltester



Meßmodus:

30 (50) μ l Probe + 30 (50) μ l NRS^R + LUMIT^R

Spermaverdünner: CUE-Tris

Probenvolumen: 30 μ l bei Wiederkäuersperma,
50 μ l bei Hengst- und Ebersperma

* RLU = Relative Light Units (Impulse/10 sec)

3.2.1.1.2. Luminometer

Im Luminometer war die Messung von unverdünnten Spermaproben der untersuchten Tierarten möglich (Abb. 6).

Das Probenvolumen betrug bei Bullen-, Schafbock- und Ziegenbocksperma 5 μ l, bei Eber- und Hengstsperma 10 μ l und bei Kaninchenbocksperma 50 μ l. Dabei erreichte man bei Kaninchenbocksperma mit einer Dichte von etwa 20.000 Spermien/mm³ und einer geschätzten Motilität von 70 % die Untergrenze des Meßbereichs und mit Ziegenbock- bzw. Schafbocksperma mit einer Dichte von über 4 Mio. Spermien/mm³ und einer geschätzten Motilität von 80 % die Obergrenze.

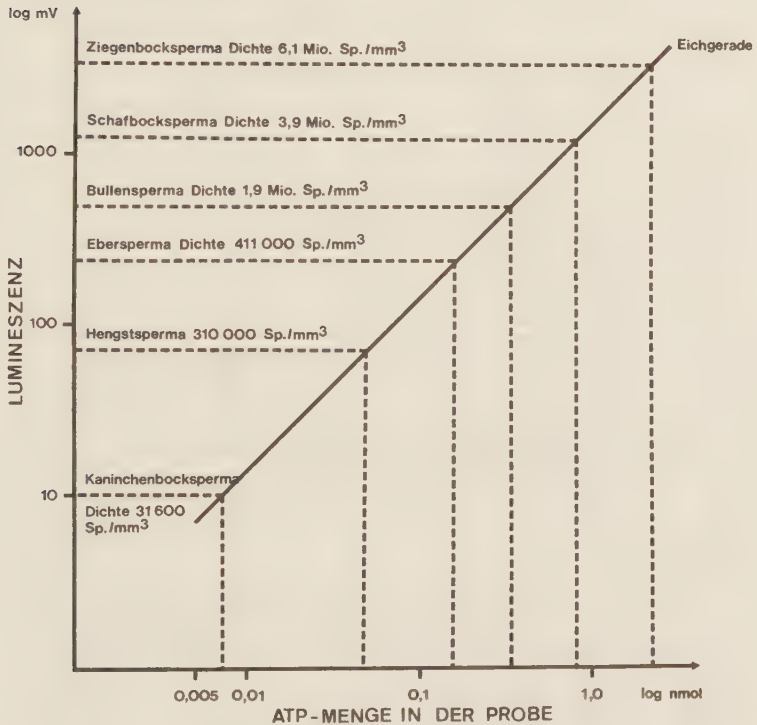
3.2.1.2. Reproduzierbarkeit der Messung von Standardansätzen und Spermaproben

Die Meßergebnisse von Standardansätzen ergaben in beiden Meßgeräten im linearen Bereich einen Variationskoeffizienten von weniger als 5 % (Celltester 4,6 %, Luminometer 1,6 %; Tab. 3).

Bei verdünnten Spermaproben (im Celltester gemessen) und unverdünnten Spermaproben (im Luminometer gemessen) war die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse geringfügig schlechter. Es ergaben sich Variationskoeffizienten von 6,4 % bzw. 6,2 % (Tab. 4).

Bei der Messung von gewaschenen Spermien verbesserte sich die Reproduzierbarkeit im Luminometer leicht (VK 4,1 %), beim Celltester lag sie etwa auf dem gleichen Niveau wie bei verdünntem Sperma (VK 6,8 %; Tab. 5). Dies war zu erwarten, da das Verdünnen des Spermias bereits eine Art Wascheffekt darstellt.

Abb. 6: Meßbereich für unverdünnte Spermaproben bei der Messung im Luminometer



Meßmodus:

AMR* + Tris-EDTA-Puffer + 5 (10 bzw. 50) µl Probe

Probenvolumen: 5 µl bei Wiederkäuersperma
10 µl bei Hengst- und Ebersperma
50 µl bei Kaninchenbocksperma

* AMR = "ATP Monitoring Reagent" (LKB-Wallac)

Tabelle 3: Reproduzierbarkeit der Messung einer ATP-Standardlösung im Celltester und im Luminometer

Standardmessung	Celltester RLU	Luminometer mV
10 µl einer 10 ⁻⁵ molaren ATP-Standard- lösung	81 82 83 76 75	156 156 154 150 154
$\bar{x}$ s + VK %	79,4 3,65 4,6	154 2,45 1,6

Meßmodus:

Celltester 10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + 90 µl Aqua dest. + LUMIT^R

Luminometer AMR + Puffer + 10 µl ATP-Standard (0,1 nmol)

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit der Messung von verdünnten Spermaproben im Celltester und unverdünnten im Luminometer

Bullensperma verd. Celltester (RLU) ^{ns}		Bullensperma nativ Luminometer (mV)	
	114		380
	102		370
	112		360
	122		370
	111		420
$\bar{x}$	112,2		380
s $\pm$	7,16		23,45
VK %	6,4		6,2

Verdünnung: 1:30 mit CUE-Tris

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der Messung von gewaschenen Spermien im Celltester und im Luminometer

Bullenspermien gew. Celltester (RLU)		Bullenspermien gew. Luminometer (mV)	
	109		160
	96		150
	93		145
	100		150
	93		145
$\bar{x}$	98,2		150
s $\pm$	6,69		6,12
VK %	6,8		4,1

Waschvorgang s. 3.1.2.2.

Meßmodus: Celltester 30 µl Probe + NRS^R + LUMIT^R
Luminometer AMR + Puffer + 5 µl Probe

3.2.1.3. Eichkurve und interne Standardisierung

Die im Luminometer ermittelten Eichwerte zeigten über den gemessenen Bereich (0,1 bis maximal 1,3 nmol) eine Linearität. Die Steigung der Eichgeraden war nicht bei allen Bestimmungen gleich, obwohl der jeweils verwendete ATP-Standard in dem vom Hersteller angegebenen Aqua dest.-Volumen gelöst wurde (2 ml beim LUMAC-Standard und 10 ml beim LKB-Wallac-Standard). Es ergab sich eine gewisse Abhängigkeit von der gelieferten Charge (Abb. 7).

Im Celltester wurden Eichwerte über einen Bereich von 0,05 bzw. 0,1 bis 1 nmol ATP gemessen. Ein linearer Verlauf ergab sich bis zu einer ATP-Menge von 0,5 nmol pro Probe (50 μ l). Bei höheren Konzentrationen "knickte" die Eichgerade ab. Die Abhängigkeit der Steigung von verschiedenen Reagenzienchargen (ATP-Standard bzw. Luciferin-Luciferase-LUMIT^R) war deutlicher ausgeprägt als beim LKB-Wallac-System (Abb. 8).

Das "Abknicken" der Eichgeraden im Celltester dürfte durch den relativ hohen Volumenanteil des Standards am Gesamtprobenvolumen bedingt sein. Bei einem Gesamtvolumen der Probe von 200 μ l führte die Zugabe von bis zu 100 μ l Standardlösung mit einem pH-Wert von 7,1 vermutlich zu einer pH-Verschiebung und damit zu einer Beeinträchtigung der Lumineszenz.

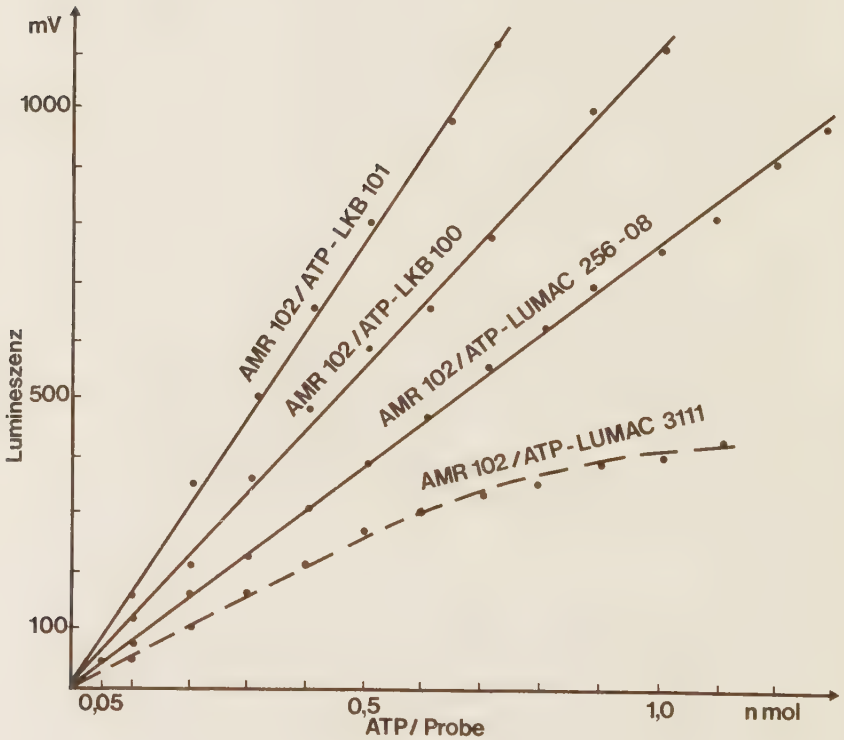
Diese Vermutung konnte erhärtet werden, weil die Messung von 100 μ l bis 1.100 μ l einer 10^{-6} molaren Standardlösung im Luminometer ebenfalls zu einem "Abknicken" der Eichgeraden führte (Abb. 7). Dies bedeutet, daß die Linearität der Eichgeraden nicht

von der ATP-Menge in der Probe, sondern vom volumemäßigen Anteil des Standards am Gesamtprobenvolumen abhängig ist. Durch entsprechende Veränderung der ATP-Konzentration von Standardlösungen, und infolgedessen des zugegebenen Volumens, konnte dies durch Bestimmung von Eichwerten im Luminometer über einen Meßbereich von 0,005 bis 5 nmol ATP pro Probe nachgewiesen werden. Die Eichkurve zeigte in diesem Bereich einen linearen Verlauf.

Das Prinzip der internen Standardisierung mit Sperma als ATP-haltiger Probe konnte am besten durch die Messung einer Spermaprobe im Luminometer und die Zugabe des ATP-Standards mit einer auf die Reaktionskammer aufgesetzten Injektionsvorrichtung (Injection device, LKB-Wallac) dargestellt werden. Die Zugabe der ATP-Standardlösung (0,1 nmol) erfolgte zu dem Zeitpunkt, als die Reaktionskurve ihr Maximum erreicht hatte (Abb. 9).

Der Vergleich mit der entsprechenden Reaktionskurve ohne Standardzugabe zeigte, daß die abfallenden Schenkel der Kurve nicht parallel verliefen, d.h. wenn in eine Spermaprobe reines ATP zugesetzt wurde, nahm die Lumineszenz des zugegebenen Standards im Lauf der Zeit relativ stark ab. Die interne Standardisierung kann deshalb zur Errechnung des ATP-Gehalts einer Spermaprobe nur herangezogen werden, wenn ATP-Zugabe, Vermischen und Messung praktisch gleichzeitig erfolgen.

Abb. 7: Im Luminometer bestimmte Eichkurven bei verschiedenen ATP-Standard-Chargen



Meßmodus:

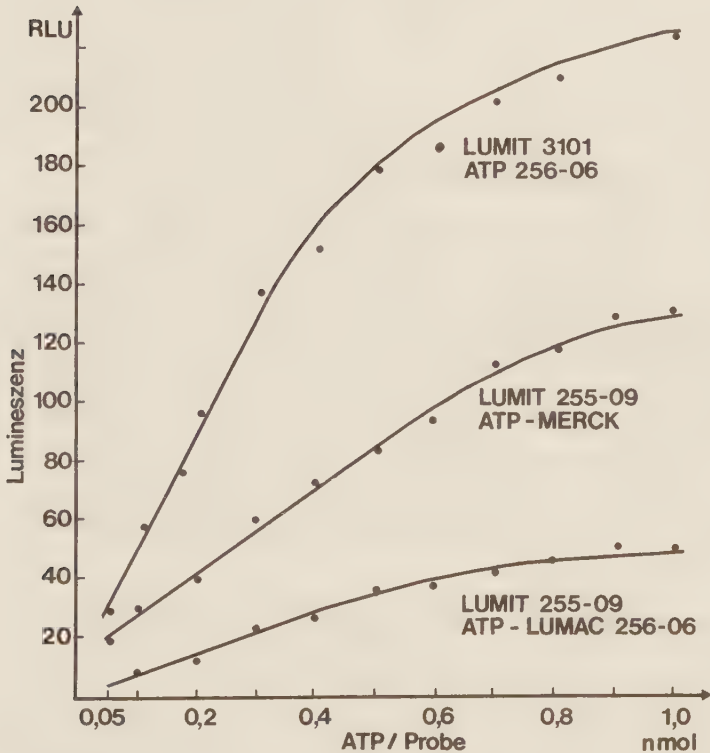
— AMR + Puffer + ATP-Standard (10^{-5} molar)

Standardvolumen: 5, 10, 20 bis max. 130 μ l

- - - AMR + Puffer + ATP-Standard (10^{-6} molar)

Standardvolumen: 100, 200 bis 1.100 μ l

Abb. 8: Im Celltester bestimmte Eichkurven bei verschiedenen Reagenzienchargen



Meßmodus:

ATP-Standard (10^{-5} molar) + LUMIT^R

Standardvolumen: 5, 10, 20 bis max. 100 μ l

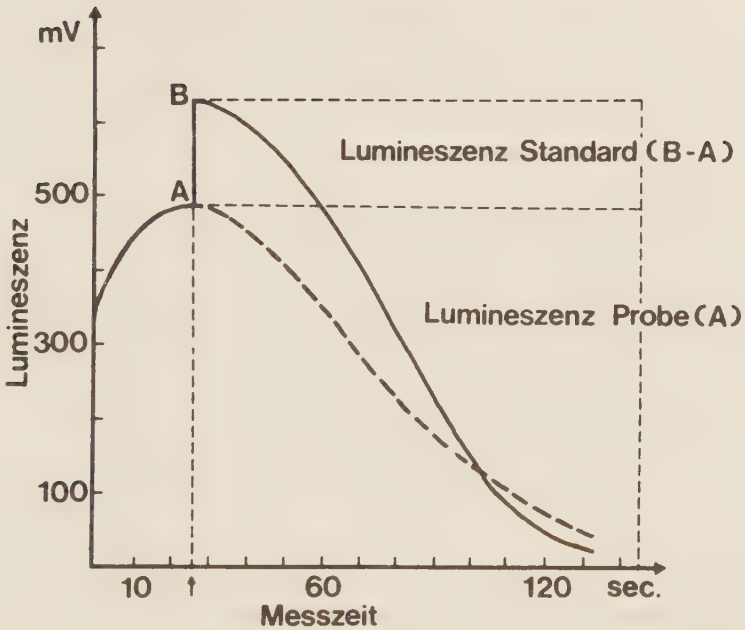
Das Probenvolumen betrug durch Aqua dest.-Zugabe konstant 200 μ l.

Im Celltester mußte für den internen Standardansatz ein neuer Meßansatz pipettiert werden, weil die Zugabe einer ATP-Standardlösung während der Messung einer Probe aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Eine korrekte interne Standardisierung war somit nicht möglich. Bei den durchgeführten Meßansätzen handelte es sich im Prinzip um eine externe Standardisierung. Für den Testansatz waren zwei Pipettiervorgänge notwendig (Probe + NRS^R), für den "internen" Standardansatz mußte dreimal pipettiert werden (Probe + NRS^R + ATP). Es ergab sich daher eine zeitliche Verschiebung bis zur Messung, da der Zeitraum für das Vermischen der Ansätze konstant gehalten wurde. In dieser Zeit wurde die Lumineszenz des ATP-Standards bereits reduziert, wie aus Abb. 9 gefolgert werden kann. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, warum die "interne" Standardisierung mit Spermaproben im Celltester nicht immer funktionierte.

Trotz Zugabe einer ATP-Standardlösung zu einer Spermaprobe waren die im Celltester gemessenen RLU-Werte manchmal nur geringfügig höher, manchmal sogar niedriger als bei Proben ohne ATP-Zugabe.

Aus diesem Grund wurden im Celltester nur vergleichende Messungen durchgeführt. Für die Errechnung des ATP-Gehalts einer Spermaprobe wurden die im Lumino-meter gemessenen Werte herangezogen (Abb. 9).

Abb. 9: Prinzip der internen Standardisierung



Meßmodus:

AMR + Puffer + 5 μ l Bullensperma (nativ)

↑ = Zugabe von 100 μ l ATP-Standardlösung (0,1 nmol)

$$\text{ATP-Gehalt/Probe} = \frac{A \times \text{zuges. ATP-Standard (0,1 nmol)}}{B - A}$$

Beispiel:
$$\frac{490 \text{ mV} \times 0,1 \text{ nmol}}{150 \text{ mV}} = 0,33 \text{ nmol}$$

----- = Reaktionskurve ohne Standardzugabe bei einer zweiten Messung

3.2.1.4. Einfluß von verschiedenen Sperma verdünnern auf das Lumineszenzsystem

Bei beiden Meßsystemen zeigte sich eine gewisse Beeinträchtigung der Lumineszenz von ATP-Standardansätzen durch die verschiedenen Sperma verdünnern. Die Stärke der Beeinflussung war bei dem hier gewählten Versuchsansatz in beiden Meßsystemen unterschiedlich.

So war beim Celltester durch Zugabe von 30 μ l Ringer-Phosphat-Puffer zu einer ATP-Standardlösung (0,1 nmol) eine Hemmung der Lumineszenz bis zu 40 % festzustellen (Abb. 10). Beim Luminometer war nach Zugabe eines Verdünnervolumens von 20 μ l bei allen Verdünnern keine, und bei einem höheren Verdünnervolumen (60 μ l und 100 μ l) eine Verringerung der Lumineszenz einer Standardlösung (0,1 nmol) bis zu 20 % (0,9 %-ige physiologische Kochsalzlösung) zu beobachten (Abb. 11).

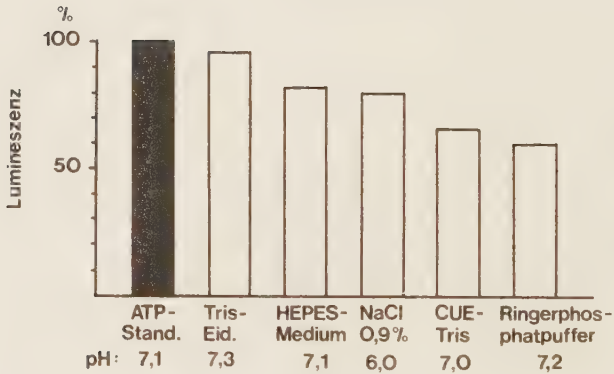
Die Ursachen für die verschieden starke Lumineszenzhemmung im Celltester und im Luminometer sind im Gesamtprobenvolumen der Meßansätze zu suchen. Bei dem geringen Gesamtvolumen der Probenansätze beim Celltester (200 μ l) war der Einfluß des Verdünneranteils größer als beim Luminometer (Gesamtprobenvolumen > 1 ml).

Der pH-Wert des Verdünners scheint insgesamt eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Eine Beeinträchtigung durch den pH-Wert war beim Celltester gar nicht, beim Luminometer erst bei einem Verdünneranteil von 100 μ l festzustellen.

Neben dem Volumenanteil dürfte bei der hier gewählten Meßart der Elektrolytzusammensetzung des Verdünners Bedeutung zukommen. Vermutlich wird durch den hohen Pufferanteil bei den Testansätzen im Luminometer die Lumineszenzhemmung vermindert.

Für beide Geräte wurde erwartet, daß die Farbe der Verdünner die Lumineszenzmessung beeinflusst (sog. "Farbquenching"). Jedoch war bei der hier gewählten Versuchsanordnung weder im Celltester noch im Luminometer eine Wirkung der tiefgelben Farbe des Tris-Eidotter-Tiefgefrierverdünners zu erkennen.

Abb. 10: Einfluß von verschiedenen Spermaverdünnungsmedien auf die Lumineszenz einer ATP-Standardlösung im Celltester

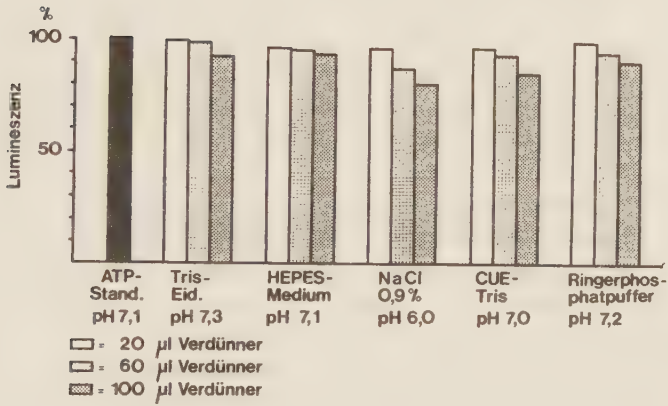


Meßmodus:

10 μ l ATP-Standard (0,1 nmol) + 30 μ l Aqua dest. + LUMIT^R

10 μ l ATP-Standard (0,1 nmol) + 30 μ l Verdünner + LUMIT^R

Abb. 11: Einfluß von verschiedenen Sperma verdün-
nungsmedien auf die Lumineszenz einer
ATP-Standardlösung im Luminometer



Meßmodus:

AMR + Puffer + 10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + Verdünner

3.2.2. ATP-Bestimmung im Sperma

3.2.2.1. Reaktionskinetik bei der Messung von Spermaproben

Bei der Messung von Sperma zeigte die Reaktionskurve der Lichtemission bei allen untersuchten Tierarten im Prinzip denselben Verlauf. Unmittelbar nach Meßbeginn stieg die Lichtemission kontinuierlich an, erreichte ihr Maximum und fiel dann über einen grossen Bereich linear ab, um sich schließlich asymptotisch dem 0-Wert zu nähern.

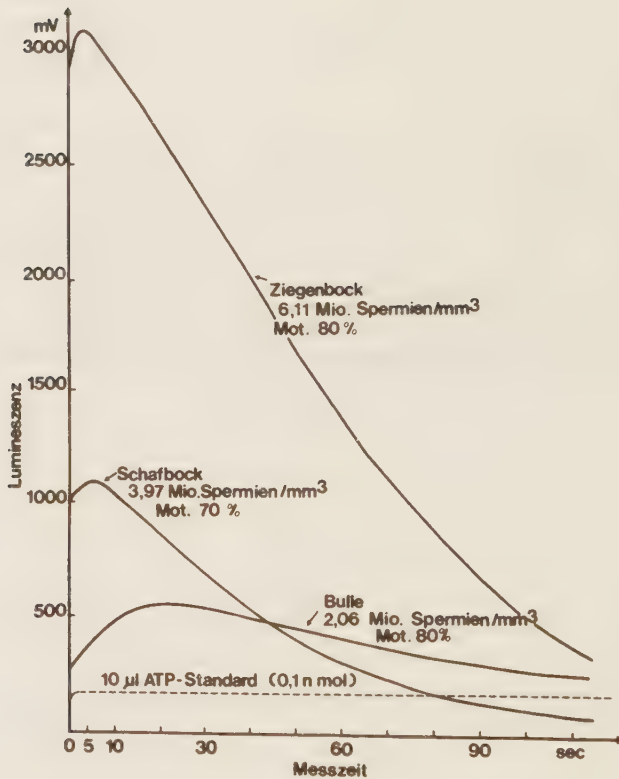
Das Kurvenmaximum schien, unabhängig von der Tierart, von der Anzahl der motilen Samenzellen in der Probe bestimmt zu werden. Bei diesen Untersuchungen fanden nur Spermaproben Verwendung mit einer geschätzten Motilität von mindestens 70 %. Speziesunterschiede waren beim Erreichen des Maximums und im Abfall der Lichtemission nach dem Maximalwert gegeben. Um dies erfassen zu können, wurde für die Zeit, in der die Lumineszenz auf 50 % des Maximalwertes abgefallen war, der Begriff "Halbwertszeit der Lumineszenz" gewählt. Der schnellste Verlauf der Lumineszenzreaktion zeigte sich bei der Messung von unverdünntem Kaninchenbocksperma, der langsamste Verlauf wurde bei unverdünntem Ebersperma beobachtet (Abb. 12 und 13, Tabelle 6).

Die Messung von gewaschenen Spermien der gleichen Ejakulate zeigte im Prinzip dasselbe Bild. Der zeitliche Verlauf war jedoch bedeutend langsamer. Die maximale Lumineszenz wurde später erreicht als bei Nativproben und der Lumineszenzabfall erfolgte langsamer. Dies hatte eine wesentlich längere Halbwerts-

zeit der Lumineszenz zur Folge. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß durch den Waschvorgang Spermien verlorengingen und daher die Dichte der Proben vermindert war, was sich auf die maximale Lichtemission auswirkte. Die Werte beim Ziegen- und Kaninchenbock müssen unter dem Gesichtspunkt gesehen werden, daß die Motilität gegenüber Nativproben bedeutend geringer war (Tab. 7).

Bei Kaninchenbocksperma konnte das Samenplasma, durch einmaliges Waschen der Spermien, nicht vollständig entfernt werden. Es ergab sich daher kein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Kurve gegenüber Nativsperma. Nach dem Waschen der Spermien in HEPES-Medium mit Ficoll-Zusatz war - wie bei den anderen Spezies - ein langsamerer Reaktionsverlauf zu beobachten.

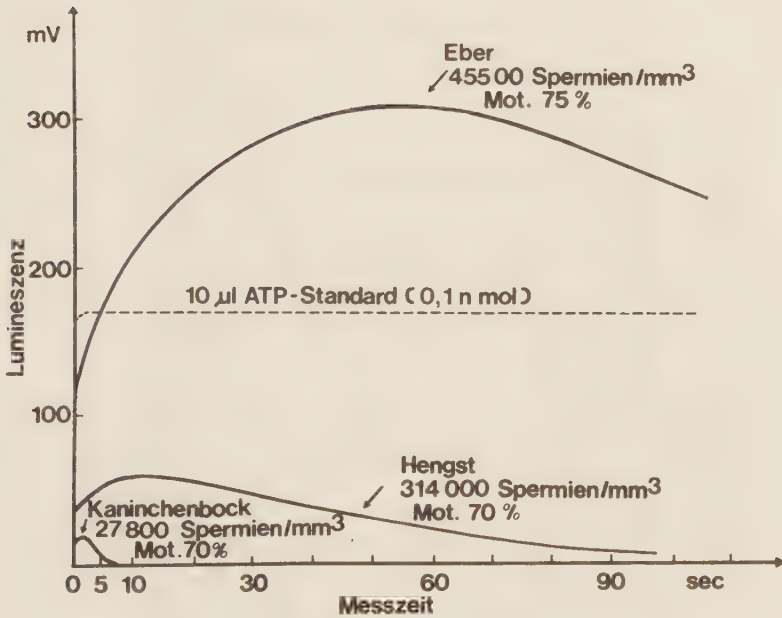
Abb. 12: Reaktionskinetik der Messung von unverdünntem Wiederkäuersperma



Meßmodus: AMR + Puffer + 5 µl Probe

0 = Meßbeginn nach einer Mischzeit
von 20 Sekunden

Abb. 13: Reaktionskinetik der Messung von unverdünntem Hengst-, Eber- und Kaninchenbocksperma



Meßmodus: AMR + Puffer + 10 (50)* µl Probe

0 = Meßbeginn nach einer Mischzeit
von 20 Sekunden

* 50 µl Probenvolumen bei Kaninchenbocksperma

Tabelle 6: Zeitlicher Ablauf der Lumineszenzreaktion bei der Messung von unverdünnten Spermaproben im Luminometer

Tierart	Spermien/Probe $\times 10^6$	geschätzte Motilität	motile Spermien pro Probe $\times 10^6$	Maximale Lumineszenz mV	nach (sec)	Halbwertszeit d. Lumineszenz (sec)
Ziegenbock	30,6	80 %	24,4	3.400	3	70
Schafbock	19,9	70 %	13,9	1.100	3	40
Bulle	10,3	80 %	8,3	530	20	110
Hengst	3,1	70 %	2,2	60	8	50
Eber	4,6	75 %	3,4	280	70	550
Kaninchen- bock	1,4	70 %	1,0	10	1	2,5

Meßmodus s. 3.1.2.1.

Tabelle 7: Zeitlicher Ablauf der Lumineszenzreaktion bei der Messung von gewaschenen Spermien im Luminometer

Tierart	Spermien/Probe $\times 10^6$	geschätzte Motilität	motile Spermien pro Probe $\times 10^6$	Maximale Lumineszenz		Halbwertszeit d. Lumineszenz (sec)
				mV	nach (sec)	
Ziegenbock	1,7	30 %	0,5	250	15	420
Schafbock	7,1	60 %	4,2	650	8	80
Bulle	6,4	70 %	4,5	300	40	320
Hengst	2,1	70 %	1,5	75	10	140
Eber	3,3	50 %	1,7	235	120	ca. 30 Minuten
Kaninchen- bock	6,1	35 %	2,1	35	1,5	14

Meßmodus s. 3.1.2.1.

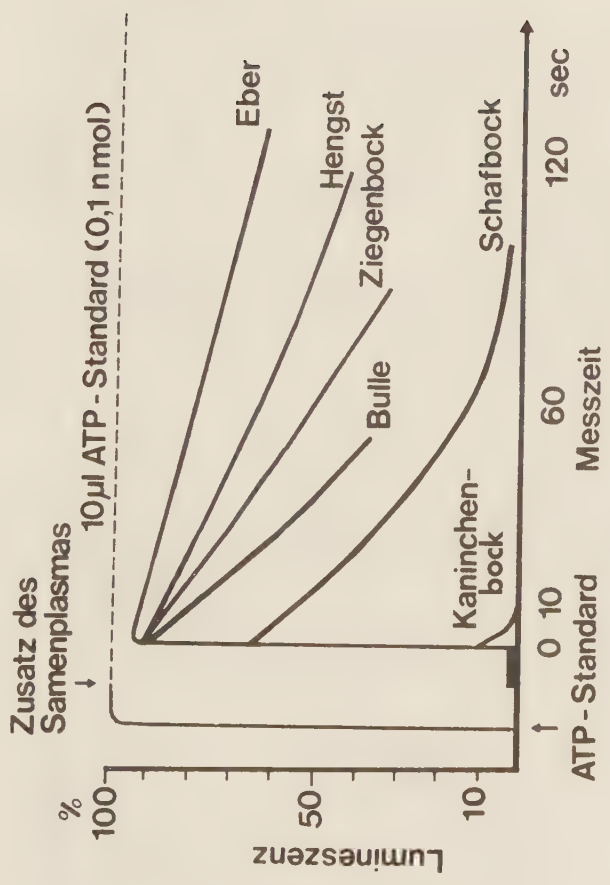
3.2.2.2. Einfluß des Samenplasmas auf die ATP-Messung

Im Samenplasma der untersuchten Tierarten (Rind, Ziege, Schaf, Pferd, Schwein, Kaninchen) war keine Lumineszenz und damit kein ATP nachweisbar.

Das Samenplasma konnte jedoch die Lumineszenz eines ATP-Standards (0,1 nmol) beeinflussen. Die Zugabe von 10 µl Samenplasma führte zu einem Lumineszenzabfall. Dieser "Effekt" war am stärksten bei Seminalplasma vom Kaninchenbock ausgeprägt. Bereits nach 10 Sekunden (5 Sekunden Mischzeit und 5 Sekunden Meßzeit) war keine Lumineszenz mehr nachweisbar (Abb. 14). Die Halbwertszeit für die Lumineszenz des ATP-Standards (0,1 nmol) betrug nach Zugabe von Schafbockseminalplasma 13 Sekunden, bei Bullenseminaleplasma 30 Sekunden, bei Ziegenbockseminalplasma 64 Sekunden, bei Hengstseminalplasma 110 Sekunden und bei Eberseminalplasma 210 Sekunden. Dies entspricht in den Relationen dem zeitlich unterschiedlichen Ablauf der Reaktion bei der Messung von unverdünnten Spermaproben der verschiedenen Spezies (Abb. 12 und 13).

Erhitztes Samenplasma bewirkte keine Beeinträchtigung der Lumineszenz. Dies galt für alle untersuchten Spezies (Rind, Ziege, Schaf, Pferd, Schwein, Kaninchen). Die Reaktionskurve erreichte sofort nach Meßbeginn den Maximalwert und verlief dann waagrecht. Bei Hengst-, Eber- und Kaninchenbockseminalplasma wurde jedoch der Maximalwert für reine ATP-Standardlösung nicht erreicht. Die Lumineszenz war um 5 % (Eber) bzw. 6 % (Hengst und Kaninchenbock) reduziert und blieb von Anfang bis Ende, über den Zeitraum von 60 Sekunden, unverändert.

Abb. 14: Einfluß des Samenplasmas der verschiedenen Tierarten auf die ATP-Messung



Meßmodus: AMR + Puffer + 10 µl ATP-Standard (0,1 nmol) + 10 µl Samenplasma

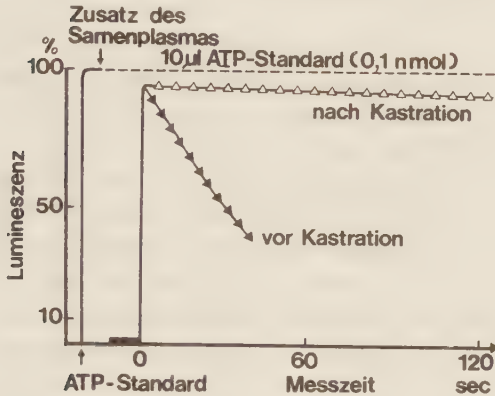
■ = Mischzeit 5 Sekunden (erforderlich, um eine homogene Durchmischung zu erreichen)

3.2.2.2.1. Einfluß von nach Kastration (Bulle) bzw. Vasoligatur (Kaninchenbock) gewonnenem Samenplasma auf die ATP-Messung

Die Beeinträchtigung der Lumineszenz durch nach Kastration bzw. Vasoligatur gewonnenes "reines" Samenplasma war bedeutend geringer als die Beeinträchtigung durch das bei der Zentrifugation aus Vollejakulaten erhaltene Samenplasma. Die Zugabe von 10 μ l Samenplasma von (nicht kastrierten) Bullen zu einem ATP-Standard (0,1 nmol) führte, innerhalb von 30 Sekunden, zu einem Lumineszenzabfall von 50 %. Das nach der Kastration gewonnene Samenplasma bewirkte eine Reduktion der Lumineszenz des Standards nach 120 Sekunden um nur 7 % (Abb. 15).

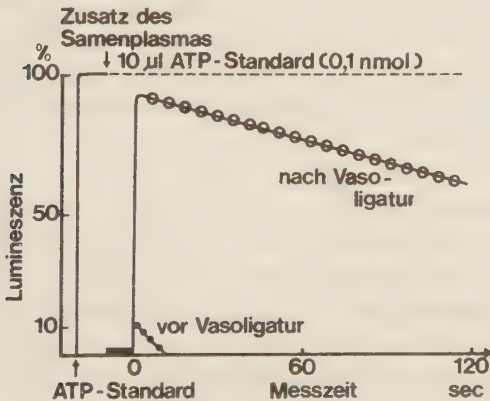
Durch Zugabe von Kaninchenbockseminalplasma zu einer ATP-Standardlösung war bereits nach 10 Sekunden keine Lumineszenz, d.h. kein ATP, mehr meßbar. Nach der Vasoligatur waren 120 Sekunden nach Samenplasma-zugabe noch 60 % des ursprünglichen ATP-Gehalts einer Standardlösung anhand der Lumineszenz nachweisbar (Abb. 16).

Abb. 15: Einfluß von nach Kastration gewonnenem Bullensamenplasma auf die ATP-Messung



Meßmodus s. 3.1.3.2.

Abb. 16: Einfluß von nach Vasoligatur gewonnenem Kaninchenbocksamenplasma auf die ATP-Messung



Meßmodus s. 3.1.3.2.

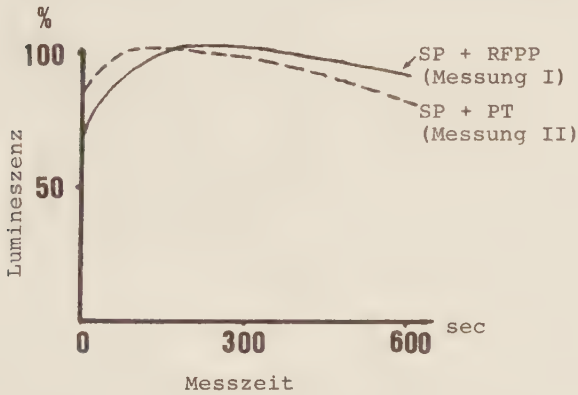
3.2.2.2.2. Einfluß von freien Protoplastatröpfchen auf die ATP-Messung

Die durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltene Protoplastatröpfchensuspension enthielt 82.700 Protoplastatröpfchen und 12.500 Spermien pro mm^3 . Die Motilität der Spermien in der Suspension betrug 50 %. Die Protoplastatröpfchendichte in den gebildeten Ansätzen (s. 3.1.3.2.2.) betrug 6.000 pro mm^3 in Ansatz 1 (Spermiensuspension und Ringer-Fruktose-Phosphatpuffer = SP + RFPP) und 37.500 pro mm^3 in Ansatz 2 (Spermiensuspension und Protoplastatröpfchensuspension = SP + PT). Mit diesen Ansätzen wurden die Messungen I-V (s. 3.1.3.2.2.) durchgeführt.

Die Reaktionskinetik der jeweiligen Messungen zeigte einen unterschiedlichen Verlauf. Bei Messung I (SP + RFPP) war nach 200 Sekunden die maximale Lumineszenz erreicht. Danach fiel die Lumineszenz sehr langsam ab, und die Messung wurde nach insgesamt 600 Sekunden abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt war ein Lumineszenzabfall um 6 % eingetreten. Bei Messung II (SP + PT) war bereits nach 100 Sekunden das Kurvenmaximum erreicht, und nach 600 Sekunden war die Lumineszenz um 22 % gegenüber dem Maximum abgefallen (Abb. 17).

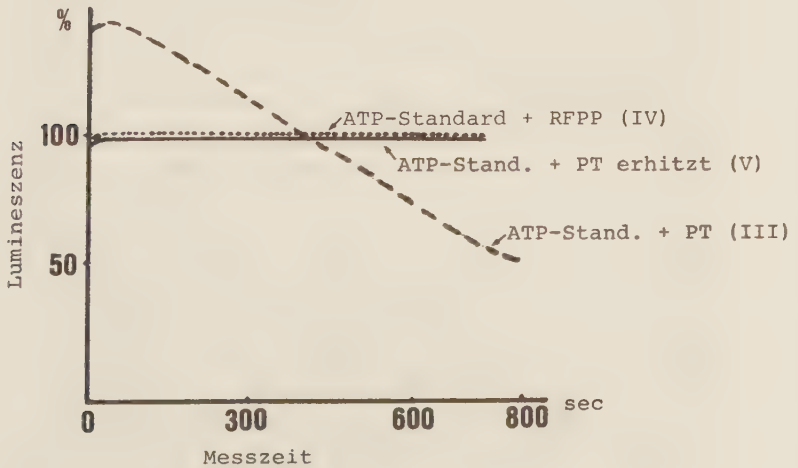
Die Messung IV (ATP-Standard + RFPP) ergab die in Abb. 18 dargestellten Werte. RFPP hatte keinen Einfluß auf den ATP-Standard. Die Reaktionskurve der Messung III (ATP-Standard + PT) zeigte zunächst eine Lumineszenzerhöhung um 48 % gegenüber Messung IV. Dies war zu erwarten, da in der PT-Suspension noch 12.500 Spermien/ mm^3 gezählt wurden.

Abb. 17: Reaktionskinetik gewaschener Spermien (SP)
mit und ohne Protoplasmatröpfchenzusatz (PT)



Meßmodus s. 3.1.3.2.2.

Abb. 18: Einfluß von freien Protoplasmatröpfchen (PT)
auf die ATP-Messung



Meßmodus s. 3.1.3.2.2.

Nach Erreichen des Maximums (nach 30 Sekunden) fiel die Kurve annähernd linear ab. Nach 800 Sekunden waren nur noch 50 % der Lumineszenz des ATP-Standards nachweisbar (Abb. 18). Bei einem vergleichbaren Ansatz von gewaschenen Spermien ohne PT-Zusatz fiel die Kurve nur geringfügig ab (6 % in 600 Sekunden, Abb. 17). Nach dem Erhitzen der PT-Suspension war kein Lumineszenzabfall bei einer ATP-Standardlösung nach Zugabe einer erhitzten PT-Suspension mehr feststellbar. Die Reaktionskurve verlief waagrecht und war mit der Kontrollkurve identisch.

3.2.2.3. ATP-Gehalt ejakulierter und gewaschener Spermien der verschiedenen Spezies

In Ejakulaten, in denen durch Erhitzen die Spermien eindeutig abgetötet waren, konnte keine Lumineszenz und damit kein ATP nachgewiesen werden. Als Bezugsgröße für den ATP-Gehalt im Sperma der verschiedenen Spezies wurden deshalb lebende Spermien gewählt und der Wert für jeweils 10^8 lebende Spermien errechnet. Der Anteil lebender Spermien in den Ejakulaten wurde vor der ATP-Messung aufgrund der Lebend-Tot-Färbung bzw. der Motilitätsschätzung ermittelt.

Der errechnete ATP-Gehalt war bei Ziegenbocksperma am höchsten ($9,5 \text{ nmol}/10^8$ lebende Spermien) und bei Hengstsperma am niedrigsten ($1,5 \text{ nmol}/10^8$ lebende Spermien). Beim Kaninchenbock war der Lebend-Tot-Ausstrich nicht auswertbar. Für die Errechnung des ATP-Gehalts wurde deshalb die Motilitätsschätzung herangezogen. Es ergab sich ein Wert von etwa $0,7 \text{ nmol}/10^8$ motile Spermien (Tab. 8).

Tabelle 8: ATP-Gehalt ejakulierter Spermien

Tierart	Dichte/mm ³ x 1.000	geschätzte Motilität	Anteil leb. Spermien	ATP-Gehalt in nmol pro 10 ⁸ lebender Spermien
Bulle 1	1.240	85 %	79 %	7,3
Bulle 2	900	80 %	83 %	8,8
Bulle 3	240	60 %	57 %	6,5
Bulle 4	420	60 %	68 %	6,4
Schafbock 1	3.970	70 %	61 %	7,2
Schafbock 2	5.200	60 %	52 %	5,0
Ziegenbock	6.110	80 %	73 %	9,5
Hengst	314	70 %	72 %	1,5
Eber 1	560	70 %	74 %	6,3
Eber 2	455	70 %	65 %	5,5
Kaninchen- bock	21,8	70 %	nicht aus- wertbar	0,7 *

* nmol/10⁸ motile Spermien

Aus den Meßergebnissen gewaschener Bullenspermien errechnete sich ein niedrigerer ATP-Gehalt (5,0 nmol pro 10^8 lebende Spermien) als bei frisch ejakulierten Spermien (6,4-8,8 nmol/ 10^8 lebende Spermien). Bei den anderen Tierarten war der ATP-Gehalt bei gewaschenen Spermien höher als bei Nativproben. Beim Ziegenbock errechnete sich ein Wert von 21,4 nmol, beim Schafbock von 13,1 nmol, beim Hengst von 3,9 nmol und beim Eber von 8,6 nmol pro 10^8 lebende Spermien. Beim Kaninchenbock lag der Wert bei 1,5 nmol pro 10^8 motile Spermien.

3.2.2.4. Beziehung des ATP-Gehalts von Spermaproben zur Spermienmotilität sowie dem Anteil lebender Spermien

Der durch Lagerung von Bullen- und Eberspermaproben bei 39°C beschleunigte Motilitätsabfall war mit einem Abfall des Anteils lebender Spermien sowie des ATP-Gehalts in den Proben verbunden (Tab. 9 und 10, Abb. 19).

Die Beziehung zwischen dem Anteil lebender Spermien und dem ATP-Gehalt in Eberspermaproben konnte nicht überprüft werden, da die meisten Lebend-Tot-Ausstriche nicht auswertbar waren.

Nachdem in den Proben die Motilität auf 0 % abgesunken war und mittels der Lebend-Tot-Färbung keine lebenden Spermien mehr festgestellt werden konnten, war auch kein ATP mehr nachweisbar. Dies war bei Bullenspermien nach 18 Stunden, bei Eberspermien nach 8 Stunden der Fall.

Bei Zimmertemperatur fiel die Motilität eines Eber-ejakulates innerhalb von 8 Stunden von 70 % auf 30 %, der ATP-Gehalt in der Samenprobe von 0,250 nmol (= 100 %) auf 0,105 nmol (= 42 %; Tab. 10).

Tabelle 9: Abfall der Motilität und des Anteils lebender Spermien sowie des ATP-Gehalts von unverdünnten Bullenspermaproben während der Lagerung bei 39°C

Zeit h	geschätzte Motilität %			"lebende" Spermien: %			ATP-Gehalt in der Probe Ausgangswert = 100 %		
	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3
0	85	60	70	84	58	68	100	100	100
1/2	80	60	60	81	51	53	67	77	64
1	60	50	50	70	44	51	63	77	56
2	60	30	40	70	35	46	61	38	55
3	50	20	30	65	30	35	56	40	51
4	20	20	30	31	21	33	28	27	49
7	5	5	10	6	13	15	4	17	29
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0

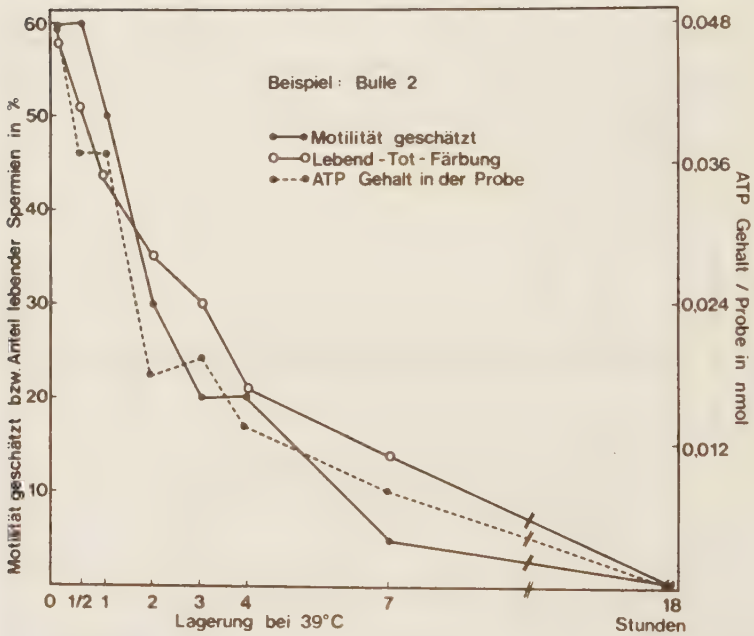
:: "lebende" Spermien = ungefärbte Spermien bei der Lebend-Tot-Färbung

Tabelle 10: Abfall der Motilität und des ATP-Gehalts in unverdünnten Eberspermaproben während der Lagerung bei 39°C und bei Zimmertemperatur

Zeit h	Brutschrank 39°C			Zimmertemperatur	
	Motilität gesch. %	ATP-Gehalt/Probe Ausgangswert = 100%		Motilität gesch. %	ATP-Gehalt/Probe Ausgangswert = 100%
	Eber 1	Eber 2	Eber 1	Eber 2	Eber 2
0	80	70	100	70	100
1/2	70	70	67	70	100
1	70	60	64	- ::	-
2	50	40	61	70	96
3	30	20	45	-	-
4	15	10	14	60	82
6	5	5	0,5	40	60
8	0	0	0	30	42

:: keine Motilitätsschätzung bzw. Lumineszenzmessung durchgeführt

Abb. 19: Abfall der Motilität und des Anteils lebender Spermien sowie des ATP-Gehalts einer Bullenspermprobe während der Lagerung bei 39°C



4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einsatzfähigkeit von zwei Lumineszenzphotometern zur ATP-Bestimmung im Sperma als Schnellmethode zu überprüfen. Die Methode wird bereits auf mikrobiologischen und biochemischen Gebieten eingesetzt (HOLMSEN et al., 1966; COLE et al., 1967; JOHNSON et al., 1970; THORE et al., 1975). Ebenso liegen erste Ergebnisse der Zellgehaltsbestimmung in der Milch mit diesem Verfahren vor (BOSSUYT, 1978; WALSER et al., 1978; BRUNNER, 1979).

Die erste Anwendung der Lumineszenzmessung zur ATP-Bestimmung im Sperma und im Samenplasma von verschiedenen Spezies wurde von BRACKETT und WILLIAMS (1967) beschrieben. Das Verfahren war damals noch aufwendig, da noch keine gereinigten Luciferin-Luciferase-Reagenzien zur Verfügung standen. Dadurch war das ganze Meßsystem nicht standardisierbar.

Nachdem die Firma LUMAC ein komplettes Meßsystem (Lumineszenzphotometer und Reagenzien) zur ATP-Bestimmung in somatischen und mikrobiellen Zellen entwickelt hatte, boten sich auch erste Anwendungsmöglichkeiten in der Spermatologie (PRINZEN, 1977; FOULKES und MacDONALD, 1979). Methodische Aspekte für den Routineeinsatz konnten von diesen Autoren mit den damals gegebenen Möglichkeiten nicht eindeutig geklärt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher diese Fragestellungen im Vordergrund stehen. Im weiteren erschien die Reaktionskinetik der ATP-Messung und der Einfluß des Samenplasmas auf die Messung besonders interessant.

Darüber hinaus wurden noch biologische Fragestellungen, wie der ATP-Gehalt der Spermien verschiedener Haustierarten sowie der Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt in Spermaproben und der Vitalität der Spermien, untersucht.

Die verwendeten Meßgeräte wiesen eine unterschiedliche Meßempfindlichkeit auf. Daher wurde für jedes Gerät ein spezieller Meßmodus gewählt. Für die Messungen von Spermaproben im LUMAC-Celltester mußte das Sperma vor der Messung bei den untersuchten Tierarten auf eine Dichte zwischen 15.000 und 50.000 Spermien pro mm^3 verdünnt werden. Dies stimmt mit dem von FOULKES und MacDONALD (1979) für frische und tiefgefrorene Bullenspermien gefundenen Meßbereich überein. Im Luminometer (LKB-Wallac) konnten mit dem hier eingesetzten Meßmodus unverdünnte Spermaproben von allen untersuchten Tierarten gemessen werden. Da es sich bei diesem Meßsystem um eine Neuentwicklung handelt, liegen für einen Vergleich noch keine Ergebnisse von anderen Autoren vor. Grundsätzlich erscheint die Messung von Nativproben jedoch als Vorteil, da die Vorbereitung der Proben vereinfacht wird. Außerdem können Spermaverdünner einerseits die Lumineszenz aufgrund ihrer Elektrolytzusammensetzung und ihres pH-Wertes hemmen, andererseits stellt eine starke Verdünnung des Spermas bereits einen Wascheffekt für die Spermien dar, was sich auf den ATP-Gehalt der Samenzellen auswirken kann (BROOKS, 1970b).

Die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse bei ATP-Standardansätzen lag in dem von den Geräteherstellern angegebenen Bereich. Es ergab sich ein Variationskoeffizient von weniger als 5 %. Bei der Messung von unverdünnten bzw. verdünnten Spermaproben sowie von

gewaschenen Spermien veränderte sich die Reproduzierbarkeit nur gering. Der Variationskoeffizient lag bei diesen Versuchen zwischen 4,1 % und 6,8 %. Die Reproduzierbarkeit bei Milchproben anhand eines größeren Zahlenmaterials ergab insgesamt einen Variationskoeffizienten von knapp unter 10 % (BRUNNER, 1979), wobei daran zu denken ist, daß hier Besonderheiten der gemessenen Zellen zur Streuung beitragen können.

Grundsätzlich zeigte sich im Luminometer ein Einfluß des Vermischens der Spermaprobe mit den Reagenzien ("ATP Monitoring Reagent" und Tris-EDTA-Puffer) auf das Kurvenmaximum und somit auf die Reproduzierbarkeit. Bei ungenügendem Vermischen von Probe und Reagenzien wird die erforderliche homogene Suspension nicht erreicht. Die Spermien setzen sich ab und die Lumineszenzreaktion kann nicht gleichzeitig in allen Zellen stattfinden oder ATP kann nicht gleichzeitig aus allen Zellen freigesetzt werden. Ein Mischeinfluß in diesem Sinn war beim Celltester nicht festzustellen, da das Vermischen des vorbereiteten Ansatzes (Spermaprobe und "nucleotid releasing reagent"-NRS^R) durch die vollautomatische Zugabe des Luciferin-Luciferase-Gemisches standardisiert ist. Eine bessere Reproduzierbarkeit als beim Luminometer war dadurch nicht gegeben.

Bei der Erstellung von Eichkurven durch die Messung von ATP-Standardansätzen bestätigte sich die Beobachtung von WALSER et al. (1978), daß die die Lumineszenz auslösenden Reagenzien noch nicht einwandfrei standardisiert sind. Dies hat zur Folge, daß für jede Charge Eichwerte erstellt werden müssen oder nur Aussagen über relative Werte gemacht werden können.

Die interne Standardisierung des Systems bei der Messung von Spermien bereitete zunächst in beiden Meßgeräten Schwierigkeiten. Mit Hilfe der Reaktionskinetik bei den Messungen im Luminometer zeigte sich dann, daß nach Zugabe von reinem ATP zu einer Spermaprobe die Lumineszenz im Lauf der Zeit abnahm (Abb. 9). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß im Sperma Substanzen enthalten sein müssen, die einen Lumineszenzabfall bewirken, oder daß während der Messung Nebenreaktionen stattfinden, durch die ATP gebunden bzw. abgebaut wird. Bei den internen Standardansätzen beim Celltester wurde die Spermaprobe schon außerhalb des Meßgerätes mit dem ATP-Standard vermischt. Die anschließend durchgeführte Messung erbrachte jedoch nicht immer höhere Lumineszenzwerte (RLU) gegenüber derselben Probe ohne ATP-Zusatz. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß das in die Probe zugegebene reine ATP bereits vor Beginn der Lumineszenzmessung, ganz oder zum Teil, abgebaut bzw. gebunden worden war.

Der "Abbaueffekt" konnte auch durch Zugabe von Samenplasma zu ATP-Standardansätzen anhand der Reaktionskinetik im Luminometer nachgewiesen werden. Bei der Messung von Standardansätzen zeigte sich folgender Reaktionsverlauf:

Unmittelbar nach Meßbeginn erreichte die Reaktion ihr Maximum und blieb dann konstant, d.h. die Reaktionskurve verlief waagrecht. Nach Zugabe von Sperma zu ATP-Standardansätzen stieg die Lumineszenz sofort an, erreichte ein Maximum und fiel dann aber wieder deutlich ab, und zwar unter das Niveau, das erwartungsgemäß den reinen ATP-Standardansätzen entsprochen hätte.

Um den lumineszenzmindernden bzw. ATP-abbauenden Faktor im Sperma herauszufinden, wurden die Ejakulate zentrifugiert und nur Samenplasma zu ATP-Standardansätzen zugegeben. Es zeigte sich nun, daß das Samenplasma für den Lumineszenzabfall, d.h. ATP-Abbau, verantwortlich ist, wobei starke Speziesunterschiede zu beobachten waren (Abb. 14). Am stärksten war der Einfluß des Samenplasmas vom Kaninchenbock und von den Wiederkäuern, der schwächste Einfluß ergab sich bei Samenplasma von Hengst und Eber. Nach Erhitzen des Samenplasmas war dieser Lumineszenzabfall nicht mehr festzustellen. Lediglich eine geringe Hemmung der Lumineszenz war noch gegeben, die auf einen unspezifischen Effekt, beispielsweise durch die Trübung des Ansatzes, zurückgeführt werden kann.

Ein ähnlicher Einfluß auf den Reaktionsverlauf von ATP-Standardansätzen wie nach Zusatz von Samenplasma war auch - jedoch in weit geringerem Maße - nach Zugabe einer Protoplasmatröpfchensuspension zu Standardansätzen zu beobachten. Nachdem im Samenplasma und in den Protoplasmatröpfchen Enzyme enthalten sind, die ATP hydrolysieren können (MANN, 1964; DOTY und DINGLE, 1968), wird angenommen, daß diese Enzyme, insbesondere ATP-asen, für den ATP-Abbau verantwortlich sind.

Um festzustellen, ob die ATP-abbauenden Substanzen den Spermienzellen anhaften bzw. in Sekretionsprodukten von Hoden und Nebenhoden enthalten sind, wurde der Samenplasmaeinfluß nach Kastration (Bulle) und Vasoligatur (Kaninchenbock) überprüft. Der Abbau von ATP durch nach Kastration bzw. Vasoligatur

gewonnenes "Samenplasma" war bedeutend schwächer als der Einfluß von nach Zentrifugation eines Voll-ejakulates erhaltenen Samenplasmas. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nur der Kaninchenversuch (Vasoligatur) voll aussagefähig ist, da sich nach Kastration der Wirkstoffgehalt der Sekretionsprodukte aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen verändert. Das Ergebnis des Kaninchenversuches deutet jedoch darauf hin, daß wenigstens ein Teil der ATP-hydrolysierenden Substanzen im Ejakulat den Samenzellen anhaftet oder aus Sekretionsprodukten von Hoden und Nebenhoden stammt.

Der "Abbaueffekt" muß bei der Interpretation der Reaktionskurven berücksichtigt werden, da die Proben vor der Messung über einen konstanten Zeitraum mit den Reagenzien (AMR + Puffer) vermischt werden mußten, um die Ergebnisse reproduzierbar zu machen. Durch das Vermischen mit dem Luciferin-Luciferase-Reagenz bis Meßbeginn wurden die Samenzellen irreversibel geschädigt. Mikroskopisch zeigte sich dabei ein sehr starkes Agglutinieren der Zellen mit sofortigem Motilitätsverlust. In vor der Messung durch Erhitzen eindeutig abgetöteten Spermien konnte keine Lumineszenz, d.h. kein ATP mehr nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die Lumineszenzreaktion an das Vorhandensein zunächst lebender Samenzellen gebunden ist. Sie kann infolgedessen dadurch stattfinden, daß entweder während des Absterbens aus der Zelle ATP freigesetzt wird, oder daß das Luciferin-Luciferase-Reagenz während des Vermischens der Probe in die Zellen eindringt. Da beide Möglichkeiten eine Permeabilität der Spermienmembran voraussetzen, ist auch denkbar, daß die zwei Vorgänge gleichzeitig nebeneinander ablaufen.

Der schnelle Reaktionsablauf bei der Messung von Spermien im Vergleich zu anderen Zellen kann deshalb nur durch folgende Hypothese erklärt werden:

Während des Vermischens von Probe und Reagenzien beginnt die Lumineszenz durch Reaktion des Enzymgemisches mit dem in der Spermienzelle enthaltenen ATP. Gleichzeitig wird ATP durch ATP-spaltende, im Samenplasma enthaltene Substanzen abgebaut. Zunächst überwiegt jedoch die ATP-Freisetzung mengenmäßig und die Reaktionskurve steigt. Wenn Freisetzung und Abbau im Gleichgewicht stehen, erreicht die Kurve ihr Maximum. Anschließend überwiegt der ATP-Abbau und die Kurve fällt ab.

Das Kurvenmaximum scheint von der Anzahl motiler bzw. lebender Samenzellen in der Probe, der zeitlich Ablauf von den in der Probe enthaltenen ATP-abbauenden Substanzen abhängig zu sein. Der schnellste Reaktionsverlauf und entsprechend der schnellste Abbau eines ATP-Standards erfolgte bei der Messung von Spermaproben bzw. Standardansätzen nach Samenplasmazugabe vom Kaninchen- und Schafbock. SCHIRREN et al. (1979) konnten in Ejakulaten vom Mann eine positive Korrelation zwischen der Spermien-dichte und dem Gehalt an ATP-asen nachweisen. Es ist durchaus möglich, daß dies nicht nur für eine Spezies gilt, sondern auch bei anderen Spezies ähnliche Zusammenhänge gegeben sind. Der starke ATP-Abbau durch Samenplasma vom Kaninchenbock macht hierbei eine Ausnahme, die nur hypothetisch erklärt werden kann. Es ist bekannt, daß den ATP-asen eine entscheidende Rolle für die Ennergiegewinnung der Spermienzelle zukommt. Beim Kaninchen ist in vivo die Zeitdauer von der Ejakulation bis zum Eintreffen

der Spermien im Eileiter mit 3^h bis 6 Stunden im Vergleich zu anderen Spezies sehr lang. Die ATP-Asen könnten daher beim Abbau des intrazellulären ATP-Pools zur Mobilisierung zusätzlicher Energiereserven von Bedeutung sein.

Mit beiden Meßgeräten sollte der ATP-Gehalt im Sperma bestimmt werden. Da die interne Standardisierung im Celltester nicht immer funktionierte, wurden die Werte aufgrund von Meßergebnissen mit dem Luminometer errechnet. Hierfür bieten sich zwei Möglichkeiten: Entweder muß bei jeder Messung ein ATP-Standard zugesetzt werden (interner Standard) oder man errechnet, anhand des jeweiligen Maximalwertes und der Eichwerte der entsprechenden Charge, den ATP-Gehalt pro Probe (Endpunktbestimmung). Da die interne Standardisierung technisch schwieriger durchzuführen war (Injection device) und bei dem hier gewählten Modus die ATP-Standardzugabe genau zu dem Zeitpunkt, als die Reaktionskurve ihr Maximum erreicht hatte, erfolgen sollte, wurde für die Errechnung des ATP-Gehalts die Endpunktbestimmung herangezogen (THORE, 1979).

In abgetöteten Samenzellen konnte keine Lumineszenz nachgewiesen werden. Als Bezugsgröße wurde daher der Anteil lebender Spermien in der Probe herangezogen. Es ergaben sich im Nativsperma Werte von 1,5 nmol pro 10^8 lebende Spermien (Hengst) bis 9,5 nmol pro 10^8 lebende Spermien (Ziegenbock).

Die in der Literatur angegebenen Werte, die mit sehr unterschiedlichen analytischen Meßmethoden erhalten wurden, schwanken zwischen 3,7 nmol pro 10^8 Spermien beim Hengst (BROOKS, 1970a) und 30 nmol pro 10^8 Spermien beim Bullen (GARBERS et al., 1973a).

Bei ATP-Bestimmungen mit dem Biolumineszenzverfahren wurden Werte von $4,2 \text{ nmol pro } 10^8$ Spermien beim Kaninchenbock (BRACKETT und WILLIAMS, 1967) bis $29,1 \text{ nmol pro } 10^8$ Spermien beim Schafbock gefunden (BROOKS, 1971). Im Vergleich dazu liegen die hier anhand der Meßergebnisse mit dem Luminometer errechneten ATP-Gehalte etwas niedriger. Dies kann einerseits durch die verschiedenen Meß- und Extraktionsmethoden bedingt sein. Andererseits muß berücksichtigt werden, daß bei Messung von Nativsperma während des Anlaufens der Lumineszenzreaktion schon ein ATP-Abbau durch Samenplasma stattfindet, so daß beim Erreichen des Kurvenmaximums nur mehr ein Teil der ursprünglichen ATP-Menge erfaßt wird. Die mit dem Lumineszenzverfahren erhaltenen ATP-Gehalte von Nativsperma sind deshalb prinzipiell nur relative Werte, die unter dem tatsächlichen ATP-Gehalt liegen. Der ATP-Wert ist nur erfaßbar, wenn alle ATP-abbauenden Substanzen beseitigt sind. Durch Waschen der Spermien ist es jedoch zum Teil gelungen, die abbauenden Substanzen aus den Proben zu entfernen. Es ergaben sich bei gewaschenen Spermien infolgedessen höhere und damit mit chemischen Verfahren besser vergleichbare Werte für den ATP-Gehalt der Spermien.

Schlußfolgerung:

Mit den überprüften Lumineszenzphotometern kann mit geringem Aufwand der ATP-Gehalt in Spermien bestimmt werden. Für die Messung im LUMAC-System müssen die Samenproben verdünnt werden; mit dem LKB-Wallac-System kann Nativsperma gemessen werden. Die Reagenzien für die Auslösung der Lumineszenz (Luciferin-

Luciferase-Gemisch) sind noch nicht ausreichend standardisiert.

Mit Hilfe des Biolumineszenzverfahrens ist es möglich, einen relativen ATP-Gehalt der Spermien zu bestimmen der etwas unter dem Absolutwert liegt. In toten Spermien und im Samenplasma kann kein ATP nachgewiesen werden. Im Samenplasma sind ATP-abbauende, hitzelabile Substanzen enthalten. Zwischen dem Prozentsatz motiler Spermien und dem ATP-Gehalt von Spermaproben besteht eine enge Beziehung. Die Methode eignet sich grundsätzlich für einen Einsatz in der spermatologischen Diagnostik zur Objektivierung der Motilitätsschätzung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- 5.1. Es wurde überprüft, ob und unter welchen methodischen Voraussetzungen der ATP-Gehalt im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren bestimmt werden kann. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen Motilität und ATP-Gehalt von Samenproben untersucht.
- 5.2. Die Messungen an Spermaproben von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst, Eber und Kaninchenbock wurden mit dem LUMAC-Celltester und dem LKB-Wallac-Luminometer durchgeführt. Die Reaktionskinetik wurde durch Darstellung des Reaktionsverlaufes mit einem Schreiber (LKB-Wallac-Potentiometer) aufgezeichnet.
- 5.3. Mit der Biolumineszenzmethode ist die ATP-Bestimmung im Sperma aller oben genannten Haustierarten möglich. Die Spermaproben müssen für die Messung im Celltester auf eine Dichte zwischen 15.000 und 50.000 Spermien pro mm^3 eingestellt werden, im Luminometer können Nativproben gemessen werden. Die Meßergebnisse von ATP-Standardansätzen sowie von Spermaproben sind unter den beschriebenen Meßbedingungen reproduzierbar. Die Reagenzien zur Auslösung der Biolumineszenz sind jedoch noch nicht ausreichend standardisiert. Im Samenplasma kommen hitzelabile, lumineszenzmindernde bzw. ATP-abbauende, Substanzen vor, die sich insbesondere bei der ATP-Bestimmung ungewaschener Spermien auswirken. Sperma verdünner können mit zunehmendem Anteil am Gesamtprobenvolumen die Lumineszenz beeinträchtigen.

5.4. Der ATP-Gehalt im Nativsperma betrug für 10^8 lebende Spermien 6,4 - 8,8 nmol beim Bullen, 5,0 - 7,2 nmol beim Schafbock, 9,5 nmol beim Ziegenbock, 1,5 nmol beim Hengst und 5,5 - 6,3 nmol beim Eber. Im Kaninchenbocksperma lag der ATP-Gehalt mit 0,7 nmol pro 10^8 motiler Spermien am niedrigsten.

Zwischen dem Anteil motiler Spermien und dem ATP-Gehalt von Bullen- und Eberspermaproben besteht eine enge Beziehung.

5.5. Die überprüften Meßsysteme sind zur ATP-Bestimmung im Sperma einsetzbar. Wegen der engen Korrelation zwischen Spermienstoffwechsel und -motilität ist die rasche und einfache Bestimmung des ATP-Gehalts mit dem Biolumineszenzverfahren grundsätzlich als zusätzlicher, objektivierbarer Parameter für die Beurteilung von Sperma möglich.

SUMMARY

In the present study it was examined under which experimental conditions the ATP content in semen can be measured by the bioluminescence system. Furthermore it was investigated if there is a relation between ATP content and motility of semen samples.

Luminescence was measured in semen of bull, ram, male goat, stallion, boar and male rabbit with a LUMAC-Celltester and with a LKB-Wallac-Luminometer. Reaction kinetics were monitored with a recorder (LKB-Wallac-Potentiometer).

ATP can be measured in semen of the above mentioned domestic animal species by bioluminescence. For the testings in the Celltester concentration of semen samples must be diluted from 15.000 to 50.000 sperm cells per mm^3 . In the Luminometer undiluted semen can be tested.

Measurement results of ATP standard samples as well as of semen samples are reproducible under the described measurement conditions. Standardisation of bioluminescent reagents is not yet satisfactory. Seminal plasma contains substances which interfere with luminescence or hydrolyze ATP respectively. This has consequences for ATP measurement of non-washed spermatozoa. Semen extenders can reduce luminescence depending on their proportion in the whole test sample volume.

The ATP content in undiluted semen amounts per 10^8 living spermatozoa from 6,4 to 8,8 nmol in bull;

from 5,5 to 7,2 nmol in ram; 9,5 nmol in male goat; 1,5 nmol in stallion and 5,5 to 6,3 nmol in boar. The lowest ATP content of 0,7 nmol per 10^8 motile spermatozoa was measured in the male rabbit. There is a close relation between the percentage of motile spermatozoa and the ATP content of semen samples from bull and boar.

The tested luminescence photometers can be used for ATP measurements in semen. Because of the close correlation between motility and metabolism of sperm cells the quick and simple measurement of ATP content is possible as an additional and objective parameter in spermatological diagnosis.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABLA, A., MROUEH, A. and J.F. DURR (1974)
The hydrolysis of ATP by the spermatozoa of man
Int. J. Biochem. 5, 787-790
- ALEDORT, L.M., WEED, R. and S. TROUP (1966)
Effects on firefly luminescent assay of RBC ATP
Anal. Biochem. 17, 268-277
- BACCETTI, B. and B.A. AFZELIUS (1976)
Sperm movement
In: Biology of the sperm cell
(Monographs Devel. Biol. Vol. 10)
Baccetti, B. und B.A. Afzelius (eds.)
S. Karger, Basel
- BAVDEK, S. and T.D. GLOVER (1970)
Alkaline phosphatase in the cytoplasmic droplet
of rabbit spermatozoa
J. Reprod. Fert. 22, 371-373
- BOSSUYT, R. (1978)
Usefulness of an ATP assay technique in evaluating
the somatic cell content of milk
Milchwissenschaft 33, 11-13
- BRACKETT, B.G. and W.L. WILLIAMS (1967)
ATP content of spermatozoa, semen, and seminal
plasma
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 1133-1136
- BROOKS, D.E. (1970a)
Acid-soluble phosphorus compounds in mammalian
semen
Biochem. J. 118, 851-857

BROOKS, D.E. (1970b)

Observations on the content of ATP and ADP in
bull spermatozoa using the firefly luciferase
system

J. Reprod. Fert. 23, 525-528

BROOKS, D.E. (1971)

Nucleotides in spermatozoa

J. Reprod. Fert. 25, 302-303

BRUNNER, C. (1979)

Zellgehaltsbestimmung in Milch nach dem Biolumineszenzverfahren

Vet. med. Diss., München

BUDDECKE, E. (1974)

Grundriß der Biochemie

4. Auflage

W. de Gruyter Verlag, Berlin - New York

COLE, H.A., WIMPENNY, J.W.T. and D.E. HUGHES (1967)

The ATP pool in *E. coli*

I. Measurements of the pool using a modified
luciferase assay

Biochim. Biophys. Acta 143, 445-453

DENBURG, J.L. and W.D. McELROY (1970)

Anion inhibition of firefly luciferase

Arch. Biochem. Biophys. 141, 668-675

DÖCKE, F. (1963)

Das Sperma

In: Die künstliche Besamung bei den Haustieren
F. Schätz (ed.)

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- DOTT, H.M. and J.T. DINGLE (1968)
Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram
Exp. Cell. Res. 52, 523-540
- DURR, J.F., ABLA, A. and A. MROUEH (1972)
ATP-ase of human spermatozoa
J. Reprod. Fert. 31, 313-316
- EIBL, K. (1959)
Lehrbuch der Rinderbesamung
Paul Parey Verlag, Berlin - Hamburg
- McELROY, W.D. (1947)
The energy source for bioluminescence in an isolated system
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 33, 342-345
- FOOTE, R.H., GRAY, L.C., YOUNG, J.C. and M.O. DUNN (1960)
Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20 % egg yolk extender
J. Dairy Sci. 43, 1330-1334
- FOULKES, J.A. and B.J. MacDONALD (1979)
The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa
Theriogenology 11, 313-319
- GARBERS, D.L., FIRST, N.L. and H.A. LARDY (1973a)
The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors
Biol. Reprod. 8, 589-598

GARBERS, D.L., FIRST, N.L., GORMAN, S.K. and H.A. LARDY
(1973b)

The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism

Biol. Reprod. 8, 599-606

GILLES, R., PEQUEUX, A., SAIVE, J.J., SPRONCK, A.C.
and G. THOME-LENTZ (1976)

Effect of various ions on ATP determinations using the "luciferine-luciferase" system

Arch. int. Phys. Biochim. 84, 807-817

GLANDIGAU, V. and G. RUHENSTROTH-BAUER (1974)

Die biologische Bedeutung eines basischen Proteins (BBSP) aus dem Seminalplasma des Rindes
Z. Naturforsch. 29c, 257-260

GREEN, A.A. and W.D. McELROY (1956)

Crystalline firefly luciferase

Biochim. Biophys. Acta 20, 170-176

HASSAN, A.G.M. (1979)

Über das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Sperma der Haustiere sowie den Einfluß freier Protoplasmatröpfchen auf Motilität und Stoffwechsel von Bullenspermien

Vet. med. Diss., München.

HEPPEL, L.A. and R.J. HILMOE (1953)

Mechanism of enzymatic hydrolysis of adenosine-triphosphate

J. Biol. Chem. 202, 217-226

- HORVATH, J. and B. SOLYMOSS (1953)
Some biochemical properties of bull semen
Acta vet. (Budapest) 3, 401-413
- HOLMSEN, H.; HOMLSEN, J. and A. BERNHARDSEN (1966)
Microdetermination of adenosine diphosphate
and adenosine triphosphate in plasma with the
firefly luciferase system
Anal. Biochem. 17, 456-473
- HOSKINS, D.D., STEPHENS, D.T. and E.R. CASILLAS (1971)
Enzymic control of fructolysis in primate sper-
matozoa
Biochim. Biophys. Acta 237, 227-238
- HOSKINS, D.D. (1973)
Adenine nucleotide mediation of fructolysis and
motility in bovine epididymal spermatozoa
J. Biol. Chemistry 248, 1135-1140
- JOHNSON, R.A., HARDMAN, J.G., BROADUS, A.E. and
E.W. SUTHERLAND (1970)
Analysis of adenosine-3',5'-monophosphate with
luciferase luminescence
Anal. Biochem. 35, 91-97
- DeLUCA, M. and W.D. McELROY (1974)
Kinetics of the firefly luciferase catalysed
reactions
Biochem. 13, 921-925
- MANN, T. (1945a)
Studies on the metabolism of semen
1. General aspects. Occurrence and distribution
of cytochrome, certain enzymes and coenzymes
Biochem. J. 39, 451-457

MANN, T. (1945b)

Studies on the metabolism of semen

2. Glycolysis in spermatozoa

Biochem. J. 39, 458-465

MANN, T. (1946)

Studies on the metabolism of semen

3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen

Biochem. J. 40, 481-491

MANN, T. (1964)

The biochemistry of semen and of the male reproductive tract

Methuen & Co. Ltd., London

NEVO, A.C. (1966)

Relation between motility and respiration in human spermatozoa

J. Reprod. Fert. 11, 19-26

NEVO, A.C. and R. RIKMENSPOEL (1970)

Diffusion of ATP in sperm flagella

J. Theoret. Biol. 26, 11-18

NEWTON, A.A. and F.R.S. LORD ROTHSCCHILD (1961)

Energy-rich phosphate compounds in bull semen: Comparison of their metabolism with anaerobic heat production and impedance change frequency

Proc. R. Soc. B. 115, 183-194

PAUFLER, S.K. (1974)

Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch

Band 1, Verlag M. u. H. Schaper, Hannover

PETERSON, R.N. and M. FREUND (1970)

ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa

Biol. Reprod. 3, 47-54

PRINZEN, R. (1977)

ATP-Bestimmung (Adenosin-Tri-Phosphat) mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien

Zuchthyg. 12, 105-108

RIKMENSPOEL, R. and G. VAN HERPEN (1969)

Radiation damage to bull sperm motility

II. Protein irradiation and respiration measurements

Biophys. J. 9, 833-844

ROGERS, B.J. and B. MORTON (1973)

ATP levels in hamster spermatozoa during capacitation in vitro

Biol. Reprod. 9, 361-369

SALISBURY, G.W. and N.L. VAN DEMARK (1961)

Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle

W.H. Freeman & Co., San Francisco - London

SALISBURY, G.W. and J.R. LODGE (1963)

Respiratory quotients of bovine spermatozoa

J. Reprod. Fert. 5, 195-202

SCHIRREN, C., LAUDAHN, G., HEINZE, I., HARTMANN, E.
and E. RICHTER (1979)

Correlation studies of morphological and biochemical parameters in human ejaculate in various andrological diagnoses

3. Correlations between morphological and biochemical parameters

Andrologia 11, 393-401

STANLEY, P.E. and S.G. WILLIAMS (1969)

Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme

Anal. Biochem. 29, 381-392

STREHLER, B.L. (1974)

Adenosin-5'-triphosphat und Creatinphosphat.

Bestimmung mit Luciferase

In: Methoden der enzymatischen Analyse, Band II

3. Auflage, H.U. Bergmeyer (ed.)

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

STREHLER, B.L. and J.R. TOTTER (1952)

Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms

I. Substrate and enzyme determination

Arch. Biochem Biophys. 40, 28-41

THORE, A., ÅNSÉHN, S., LUNDIN, A. and S. BERGMAN (1975)

Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate

J. Clin. Microbiol. 1, 1-8

THORE, A. (1979)

Technical aspects of the bioluminescent firefly
luciferase assay of ATP
Science Tools 26, 30-34

VOGLMAYR, J.K., SCOTT, T.W., SETCHELL, B.P. and
C.M.H. WAITES (1967)

Metabolism of testicular spermatozoa and
characteristics of testicular fluid collected
from consicions rams
J. Reprod. Fert. 14, 87-99

WALSER, K., PRINZEN, R. und C. BRUNNER (1978)

Erste Ergebnisse der Zellgehaltsbestimmung in
Milch durch ATP-Messung nach dem Biolumineszenz-
verfahren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 373-375

WEITZE, K.F. (1976)

Bedeutung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-
Aktivitätsmessungen in der spermatologischen
Diagnostik
Zuchthyg. 11, 62-67

LEBENS LAUF

Am 17.3.1954 wurde ich als erstes Kind des Viehkaufmanns und Landwirts Friedrich Pfetsch und seiner Ehefrau Emma, geb. Schmid in Berghülen/Alb-Donau-Kreis geboren. Von 1961-1965 besuchte ich dort die Volksschule und wechselte dann auf das Progymnasium in Laichingen.

Am 27.6.1973 bestand ich die Reifeprüfung am Wirtschaftsgymnasium in Ulm. Im Wintersemester 1973/74 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München und schloß im Herbst 1978 mit dem Staatsexamen ab.

Seit November 1978 war ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

Herrn Prof. Dr. W. Leidl danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem allen Angehörigen des Lehrstuhls, besonders Frau R. Haitchi für die Mithilfe beim Auswerten der Ausstriche und die kritische Überprüfung der Motilitätsschätzungen sowie Herrn Dr. J. Braun für die Hilfe beim Isolieren der Protoplasmatröpfchen.

Besonders herzlich danken möchte ich Frau Dr. G. Buck für die wertvollen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen.

